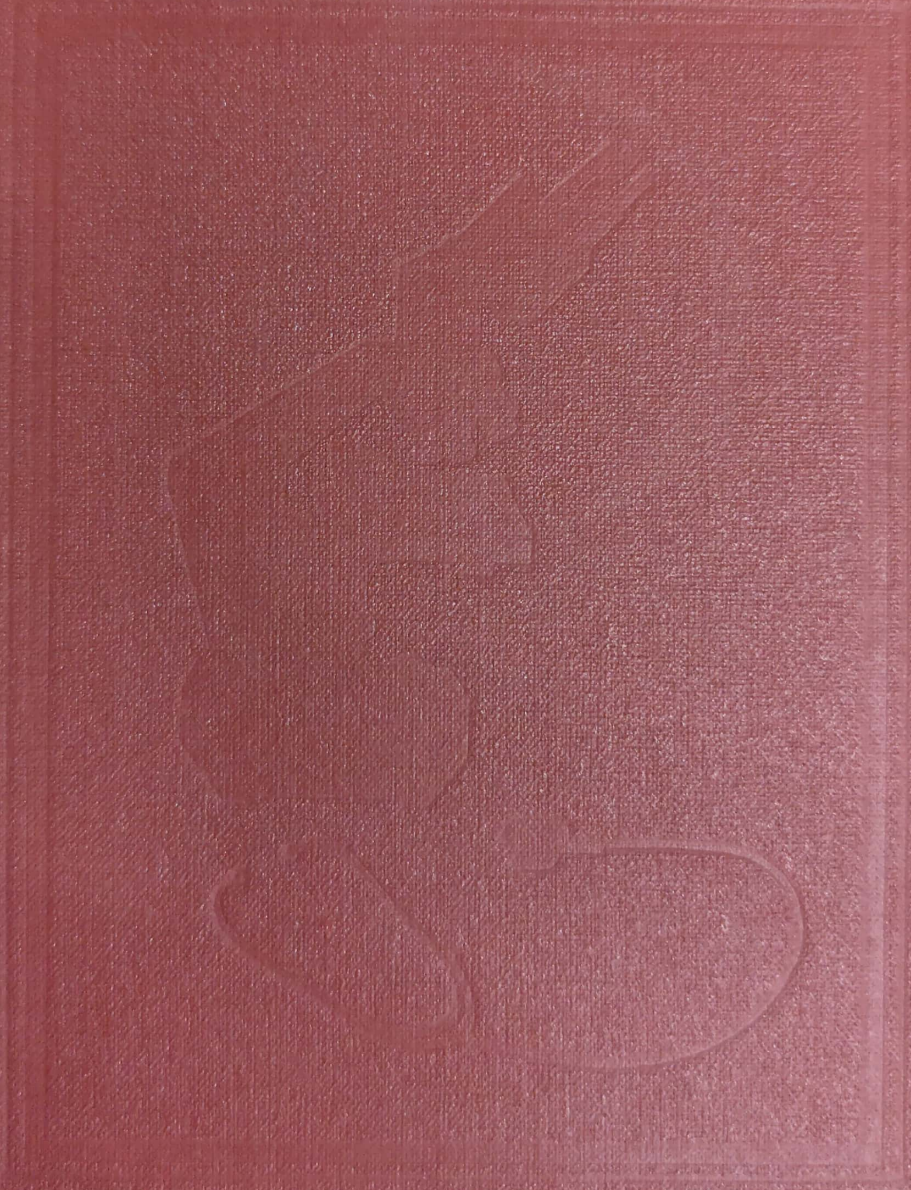
M. BALŞ

LABORATORUL CLINIC ÎN INFECŢII



EDITURA MEDICALĂ

Scanned with OKEN Scanner

616.9
B23

M. BALŞ
Membru titular al Academiei de Ştiinţe Medicale
Laureat al Premiului de Stat clasa I

LABORATORUL CLINIC ÎN INFECŢII

EDITURA MEDICALĂ — BUCUREŞTI, 1982

978625

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Lucrarea este scrisă pentru clinicieni, în special infecționiști și medici reanimatori și de terapie intensivă, în primul rînd, pentru a fi utili bolnavilor, pentru a face posibilă și a întări colaborarea eficace cu medicii de laborator bine orientați în patologie, pentru a evita ca medicii tratanți să devină sclavii nediscriminatori ai unor tehnicieni de laborator negînditori și pentru a-i face receptivi la observațiile, sugestiile și eventual la directivele date de unii medici de laborator cu calificare superioară.

Lucrarea nu se substituie și nu scutește consultarea manualelor de specialitate de laborator clinic, dar triază doar cele mai simple, cele mai accesibile și deseori cele mai utile analize, pentru orientarea rapidă a diagnosticului și a tratamentului infecțiilor.

În 1946, am scris și ilustrat o broșură intitulată „Examene curente de laborator" (necesare cunoașterii și tratării bolilor contagioase), adresată externilor și internilor serviciului de boli contagioase. S-au folosit în acea lucrare date din literatură verificate practic, învățămintele profesorului Th. Mironescu, observațiile și sugestiile unor medici cu mare experiență ca dr. C. Fulga și dr. D. Răileanu.

Lucrarea de față, cu aproape același scop, își păstrează caracterul eminamente practic, dar are o adresabilitate mult mai largă, care cuprinde: studenții în medicină, medicii stagiari, medicii secundari, medicii clinicieni de orice specialitate, medicii de laborator, care sînt implicați (direct sau indirect) în recunoașterea, tratarea și prevenirea infecțiilor. Conținutul a fost restrîns, suprimîndu-se din lucrarea amintită unele analize și comentarii, menținînd ceea ce este mereu valabil și adăugînd o serie de investigații și explicații, care astăzi au devenit necesare.

Am folosit o documentare mult lărgită, experiența și tehnicile standardizate din mai multe centre din străinătate și din țară, experiența obținută în decursul anilor de către colectivul Clinicii postuniversitare de boli infecțioase din București, care este în special solicitată pe probleme practice variate de patologie infecțioasă, precum și materialele elaborate de Catedra de microbiologie de la Iași. Marea majoritate a tehnicilor nu sînt originale, dar „de la lume adunate și iarăși la lume date".

Lucrarea are ca obiectiv principal să fie o călăuză în alegerea și executarea diferitelor investigații elementare de bază, care sînt, sau pot fi, la îndemîna aproape a oricărui spital.

Scanned with OKEN Scanner

Diviziunea muncii, cu specializarea și hiperspecializarea, a fost și este condiția esențială a progresului. Ei se datorează progresele uriașe înregistrate în toate ramurile cunoștințelor omenești. În medicina clinică și în laborator, pe lîngă latura pozitivă, care o face absolut indispensabilă, ea are drept rezultat negativ o dezmembrare a medicinii, o lipsă de acoperire a domeniilor de graniță și mai ales ea face extrem de dificilă colaborarea între specialități. Fiecare specialist își adîncește și își diversifică cunoștințele sale de ultraspecialist, folosind deseori o terminologie și chiar un jargon propriu, uitînd deseori că scopul final, rostul său de a fi, este să fie de folos bolnavului !

Se spune că de mult, de mult de tot, în urma unei inundații catastrofale (potopul), un rege, Babel, a întreprins construcția unui turn, care trebuia să fie mai înalt decît cota maximă a unui eventual nou potop. Lucrătorii însă, aglomerați într-un spațiu redus (suprapopulat), au început să nu se mai înțeleagă între ei, să le crească agresivitatea și se spune că astfel au luat naștere diferitele limbaje, diferitele populații cu interesele lor proprii și chiar cu o supraestimare proprie și o ostilitate sau chiar o agresiune față de celelalte grupări de populație. Această stare s-a perpetuat de-a lungul secolelor. În timpurile noastre, se fac eforturi pentru o înfrățire între popoare și pentru colaborări bilaterale avantajoase.

Același scop l-am urmărit în această lucrare (poate în mod utopic), căutînd să ne facem drum prin jungla specialiștilor medicali și paramedicali, folosind nu numai lucrările de specialitate, dar și experiența acumulată în decursul anilor în preocuparea permanentă de a veni în ajutorul bolnavilor și de a încerca (deseori în zadar) transmiterea aceleiași preocupări și noilor generații.

★

În lucrarea de față, se va face o scurtă trecere în revistă a patologiei infecțioase, arătînd totodată aspectele ce le îmbracă actualmente evoluția acestei patologii, rolul jucat de reactivitatea organismului, de schimbarea ecologiei microbiene, de germenii clasic denumiți „patogeni" și de acei condiționat patogeni sau oportuniști, precum și de influența uzului și abuzului de antibiotice, ca factor de presiune selectivă în perturbarea echilibrului biologic.

Se vor trece în revistă mijloacele de care dispunem pentru diagnosticul infecțiilor, rolul și organizarea laboratorului pentru cercetări urgente de orientare sau pentru cercetări speciale. Vom insista asupra tehnicilor simple, care de obicei sînt la îndemîna medicilor sau care pot fi improvizate în spitale, amintind uneori și direcții de perspectivă, dar fără a dezvolta toate aspectele particulare ale diverselor specialități de laborator, care fac subiectul unor numeroase cărți de specialitate.

În decursul lucrării se va indica mersul logic al investigațiilor și ierarhizarea lor.

Se vor cita investigațiile simple și rapide de orientare, în funcție de urgența lor și, mai ales, în acordarea priorității acelor investigații, care pot duce nemijlocit la sentința terapeutică, eventual profilactică (antiepidemică), sau de prognostic, lăsînd pe planul al doilea cercetările de finețe, de mare specialitate, de interes sau curiozitate științifică sau epidemiologică.

Scanned with OKEN Scanner

Se vor aminti unele examene clasice, bine descrise în cărțile de specialitate, dar indispensabile, des neglijate sau incorect executate și care ar trebui cunoscute și corect executate, la nevoie, chiar de clinicienii care au de tratat infecții.

Se va insista asupra răspunderii clinicianului în prescrierea investigațiilor, cînd, cum și unde trebuie recoltate produsele patologice, ce informații trebuie să cuprindă buletinele de analiză și cum trebuie transportate în timp util la laborator produsele de examinat (hemoculturi, uroculturi, L.C.R., lichide de puncție, spută, fecale etc.).

Se va insista asupra necesității și valorii deosebite a examenelor extemporanee, directe, macroscopice și microscopice, ale produselor patologice și, mai ales, asupra necesității confruntării laborator-clinică a acestor analize. Se va analiza concordanța sau neconcordanța și motivele acesteia din urmă.

Se vor discuta criteriile clinice, evolutive și de laborator, care pot fi folosite în implicarea unui anume agent în etiologia unui anume bolnav (criterii prezumtive sau de certitudine de patogenitate, pentru bolnavul care trebuie studiat și tratat).

Se va dezvolta (poate în mod exagerat) testarea sensibilității germenilor la antibiotice și concluziile terapeutice care se pot deduce, ca și determinarea nivelului de antibiotice și acțiunea antimicrobiană a sîngelui sau a altor produse. Se vor face unele comentarii asupra farmacokineziei, asupra distribuției și dinamicii nivelului de antibiotic, în lumina biodisponibilității antimicrobiene.

Se vor discuta determinările de concentrații minime inhibitorii (CMI) și bactericide (CMB), nivelul de eficiență inhibitorie (NEI) și bactericidă (NEB) față de un antibiotic sau de combinația a două antibiotice.

Se va discuta rolul investigațiilor în surprinderea schimbării florei patogene și a unei eventuale instalări de rezistență (mutațională sau de transfer).

Valoarea examenelor de laborator depinde în mod nemijlocit de priceperea și mai ales de conștiinciozitatea acelora care execută prelevările și care execută analizele propriu-zise, precum și de interpretarea lor sintetică. O recoltare incorectă și o prelucrare neglijentă duc la rezultate inutilizabile sau periculoase. Cărțile și tratatele de specialitate sînt indispensabile pentru descrierea diferitelor analize, dar tehnica propriu-zisă nu se învață din carte, ci numai lucrînd în laborator, iar valorificarea rezultatului nu se poate face decît prin controlul de calitate și, mai ales, printr-o continuă confruntare cu clinica.

Investigațiile descrise vor constitui alfabetul, scheletul sau preludiul oricărei dezvoltări ulterioare cerute de diferitele situații particulare posibile și de evoluția lor.

Expunerile făcute în prezenta lucrare sînt redate în spiritul de lucru al regretatului profesor Th. Mironescu (chiar el a fost elev al unui medic de plasă, care deși a ajuns mare bacteriolog — se chema Robert Koch — nu a uitat niciodată că înainte de toate era medic). Profesorul Mironescu a căutat să învețe pe elevii lui, printre multe altele, următoarele trei lucruri :

Scanned with OKEN Scanner

1. Medicul tratant trebuie chiar el să știe să caute, să recunoască și să dea valoarea exactă a tuturor semnelor prezentate de bolnav, atît clinice cît și de laborator.

2. Nu este permis, mai ales în cazurile grave, să se piardă inutil nici o oră pentru stabilirea unui diagnostic care poate contribui la aplicarea unui tratament medical sau medico-chirurgical potrivit.

3. Mai presus de toate, ceea ce este însă mai greu și nu se învață din carte, medicul trebuie să aibe conștiință profesională.

★

Lucrarea de față nu ar fi fost posibilă fără ajutorul și contribuția, directă sau indirectă, a maeștrilor și a colaboratorilor mei. Dr. Fl. Căruntu, zi de zi, timp de peste un sfert de veac, a contribuit cu perseverență și pricepere la bunul mers al laboratorului clinic, a revăzut textul prezentei lucrări, făcînd o serie de completări, corecturi și îmbunătățiri, pentru care îi mulțumesc pe această cale.

Autorul

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

1. GENERALITĂȚI (MOTIVAREA LUCRĂRII) 11

1.1. Laboratorul minimal al clinicianului 11
1.2. Patologia infecțioasă și tendințele ei actuale 15
1.3. Laboratorul de analize medicale 32
1.3.1. Observații preliminare 32
1.3.2. Organizarea și ierarhizarea unităților sanitare (inclusiv a laboratoarelor), cu fixarea competențelor și eșalonarea analizelor medicale 35
1.3.3. Responsabilitățile și sarcinile personalului medical (în clinici și în laborator) în privința analizelor medicale 44
1.3.4. Înzestrarea laboratoarelor 44
1.3.5. Conduita în laboratoare. Reguli generale. 48
1.3.6. Recoltarea, transportul și conservarea materialelor patologice . 54
1.3.7. Manopere elementare 58
1.3.8. Controlul de calitate 71
1.3.9. Valoarea analizelor 73

2. ANALIZE CURENTE ELEMENTARE DE LABORATOR 75

2.1. Probleme generale 75
2.1.1. Analize elementare complexe pe produse patologice 75
2.1.2. Metodologia diagnosticului infecțiilor 76
2.1.3. Cele trei analize morfotinctoriale minimale de neînlocuit . . 78
2.2. Analize sumare de sînge 84
2.2.1. Examenul morfologic al sîngelui 86
2.2.2. Numărători de elemente figurate sanguine 105
2.2.3. Cercetări diverse în sînge 109
2.2.4. Explorarea sumară a hemostazei 112
2.2.5. Hemocultura 115
2.2.6. Analize simple, elementare de imunologie 123
2.3. Urocultura 130
2.4. Lichidul cefalorahidian 139
2.5. Examenul exsudatului faringian și nazal, pentru diagnosticul infecțiilor căilor respiratorii superioare 152

Scanned with OKEN Scanner

2.6. Examenul sputei pentru diagnosticul infecţiilor tractusului respirator inferior 157
2.7. Lichidul gastroduodenal 165
2.8. Materiile fecale. Coproculturi şi examenul coproparazitologic . . 169
2.9. Exsudate, transsudate, puroi şi colecţii închise 184
2.10. Pielea şi mucoasele exterioare (produse patologice din focare infecţioase, deschise în exterior) 191
2.11. Recoltări la necropsie. Puncţia-biopsie. Biopsia 193

3. PRINCIPALII AGENŢI PATOGENI 199

3.1. Observaţii generale 199
3.2. Descrierea sumară a principalilor germeni 203
3.2.1. Bacterii şi infecţii bacteriene 203
3.2.1.1. Coci grampozitivi aerobi şi anaerobi 203
3.2.1.2. Coci gramnegativi aerobi şi anaerobi 207
3.2.1.3. Cocobacili gramnegativi şi bacili scurţi gramnegativi pleomorfi aerobi 209
3.2.1.4. Bacili gramnegativi aerobi 211
3.2.1.5. Bacili gramnegativi anaerobi 213
3.2.1.6. Bacili sau alţi germeni pleomorfi gramnegativi greu clasificabili 213
3.2.1.7. Bacili grampozitivi aerobi şi anaerobi 214
3.2.1.8. Micobacteriile 218
3.2.1.9. Spirili şi spirochete 220
3.2.1.10. Agenţi microbieni defectivi, obligatoriu intracelulari, mici (sau chiar la limita vizibilităţii cu microscopul optic) . . 222
3.2.2. Virusuri şi viroze 222
3.2.3. Fungi (ciuperci parazite) şi micoze 223
3.2.3.1. Observaţii generale 223
3.2.3.2. Dermatomicoze 226
3.2.3.3. Micoze subcutanate 226
3.2.3.4. Micoze ale ochiului (keratomicoze) 227
3.2.3.5. Micoze levuriforme de largă răspîndire 227
3.2.3.6. Micoze sistemice 229
3.2.4. Paraziţi şi parazitoze 231
3.2.4.1. Paraziţi intestinali şi ai anexelor (ficat, căi biliare) şi ai tractusului genital 232
3.2.4.2. Paraziţi (protozoare) cu localizare sistemică 244
3.2.4.3. Paraziţi (viermi) cu localizare neenterală 254

4. LABORATORUL ŞI TERAPIA ANTIMICROBIANĂ 256

4.1. Noţiuni generale 256
4.2. Scopuri. Precizări de termeni. Metode 258
4.3. Antibiograma 259
4.3.1. Metoda difuzimetrică 261
4.3.1.1. Antibiograma „oficială“ 264
4.3.1.2. Alegerea antibioticelor pentru antibiograma difuzimetrică 270
4.3.1.3. Incubarea, citirea şi interpretarea rezultatelor. Cauze de eroare 271
4.3.1.4. Critica, din punct de vedere teoretic a tehnicii antibiogramei difuzimetrice „oficiale“ 277
4.3.1.5. Tehnici de compromis. Necesitatea unor controluri. Condiţii de acceptabilitate 281

Scanned with OKEN Scanner

4.3.1.6. Tehnica comparativă îmbunătățită 282
4.3.1.7. Antibiograma cu asocieri de antibiotice 287
4.3.1.8. Aprecierea acțiunii bacteriostatice (CMI) și bactericide (CMB) 289
4.3.1.9. Aprecierea orientativă a nivelului de eficiență inhibitorie (NEI) și bactericidă (NEB) 291
4.3.1.10. Aprecierea orientativă a concentrației de antibiotice în ser, în L.C.R. sau în alte produse 292
4.3.2. Metoda diluțiilor 293
4.3.2.1. Determinarea de CMI și CMB în mediu lichid prin metoda diluțiilor 293
4.3.2.2. Determinarea acțiunii antibacteriene a unor produse patologice, față de germenul în cauză (NEI, NEB), prin metoda diluțiilor 296
4.3.2.3. Dozarea antibioticelor (biologic active) în ser, în L.C.R. sau în alt produs, prin metoda diluțiilor 298
4.3.2.4. Controlul eficienței și al nocivității eventuale a tratamentului antimicrobian 298
4.4. Cercetări speciale pentru studiul substanțelor antimicrobiene . . . 300

ANEXE

1. GENERALITĂȚI (MOTIVAREA LUCRĂRII)

1.1. LABORATORUL MINIMAL AL CLINICIANULUI (PLEDOARIE PRO DOMO)

În prezenta lucrare, se pledează pentru o mai eficace orientare a clinicianului, pentru unele măsuri organizatorice și pentru o oarecare descentralizare a unor analize elementare, orientative și rapide.

— Analizele *simple*, de valoare orientativă sau sugestivă, care nu cer nici aparatură specială și nici o tehnicitate deosebită și care pot fi efectuate rapid „la patul bolnavului", sînt și trebuie să fie la îndemîna clinicianului.

— O serie de analize de natură *interpretativă*, ca de ex. judecarea unei imagini morfologice (macroscopice, radiologice, microscopice etc.), trebuie privite în contextul tuturor datelor obținute atît de la clinician, cît și de la specialistul de laborator. Colaborarea reciprocă între clinică și laborator este indispensabilă. Din această cauză, recomandăm călduros ca, și la noi în țară, ca în multe alte țări, clinicianul să-și completeze examenul bolnavului cu o vizită la laborator, cu examenul unui clișeu radiologic, cu examinarea unui preparat microscopic. De multe ori, clinicianul conștiincios poate face chiar el unele analize simple și rapide, care să-i orienteze atitudinea curativă sau să-l orienteze către noi investigații, degajînd laboratorul central de o serie de analize (unele lungi și costisitoare), care devin inutile.

Toate analizele, în special cele biochimice, care dau rezultate cantitative, cifrice, precum și analizele mai pretențioase de identificare, trebuie executate de specialiști de laborator, iar clinicianul trebuie să preia rezultatele ca atare, el intervenind numai în controlul final de calitate și anume în confruntarea rezultatului de pe buletin cu bolnavul ce-l are de tratat.

Lucrarea se referă la analizele elementare curente de laborator clinic necesare cunoașterii și tratării infecțiilor. Prin *laborator clinic*, înțelegem acel laborator care trebuie, în mod nemijlocit, să fie în folosul bolnavului căruia i se face analiza respectivă, și nu, după cum se înțelege uneori, acel laborator (laborator de analize medicale), care lucrează produse provenite de la pacienți, indiferent dacă sau cînd ar avea o aplicabilitate pentru persoana care a furnizat materialul prelucrat.

Scanned with OKEN Scanner

— În multiple activități omenești, inclusiv în domeniul analizelor medicale, s-a produs în decursul anilor o continuă *evoluție spre progres*. S-a trecut treptat de la ceea ce era simplu, ieftin, rapid, de la tehnici improvizate sau folosind o aparatură simplă și ingrediente puține, materiale recuperabile și la îndemîna oricui, dar care dădeau de obicei doar rezultate orientative, la analize mai precise, la analize mai specifice, bine reproductibile, standardizate și care cuprindeau un număr mult mai mare de aspecte. Acestea însă erau mai laborioase, mai complexe, necesitau aparate, dispozitive și ingrediente mai pretențioase, materiale de calitate superioară, eventual de unică utilizare și mai scumpe. Pentru executarea lor, se cere o specializare și supraspecializare tehnică din ce în ce mai îngustă. „Progresele" neîncetate ale științei și tehnicii au dus la perfecționarea, înmulțirea și diversificarea analizelor și a tehnicilor, al căror sortiment se dublează în unele țări, aproximativ la fiecare 5—10 ani. Această evoluție este necesară progresului științific. Trebuie însă observat că majoritatea persoanelor își închipuie că „analiza" pune diagnosticul de boală și implicit de tratament, cînd de fapt nu face decît să contribuie la confirmarea unei suspiciuni clinice. Dorința multor bolnavi este să-și facă „toate analizele", fără să-și dea seama nici de ceea ce înseamnă aceasta și nici la ce ele pot să-i folosească.

— Creșterea continuă a sortimentelor de analize, a timpului necesar, a prețului ce trebuie plătit, nu numai bănesc, dar și în privința spațiului, a aparaturii, a ingredientelor, a numărului și diversificării cadrelor și formării lor necesare pe profilurile înguste etc., întrece de multe ori posibilitățile instituțiilor medicale. În plus, multitudinea și diversitatea analizelor satisfac mai degrabă interesul științific al cercetătorilor sau rezolvă doar retrospectiv unele probleme clinice de diagnostic sau de patogenie sau probleme epidemiologice, decît interesul imediat al bolnavului, care solicită un tratament.

— Specializarea *excesivă* în laborator îngreuiază sau face chiar imposibil un dialog eficace între clinician și medicul de laborator, care au în bună parte puncte de vedere deosebite : clinicianul apără interesul bolnavului, dorind să-l ajute cît mai repede și mai bine, în timp ce medicul de laborator apără corectitudinea, specificitatea și precizia tehnicilor, pe care le are de executat.

— Un aspect deosebit de grav prin consecințele lui, dar care este din nefericire des întîlnit în multe unități sanitare, este acela ca, din dorința unei extreme precizii și specificități, dar poate și din comoditate sau din snobism, să se renunțe la tehnicile simple, rapide (uneori doar de valoare orientativă), dar absolut de neînlocuit.

★

Punctul de laborator clinic minimal. În spitalele noastre, spre deosebire de acelea din alte țări, se neglijează organizarea și înzestrarea minimală a unor puncte, unde să se poată face repede și în imediata vecinătate a bolnavului unele analize. *Se neglijează, deseori, simplul examen microscopic al unui produs patologic, cînd (de multe ori) acest examen este singurul, care poate asigura diagnosticul unei infecții.*

Scanned with OKEN Scanner

În țările avansate, există din ce în ce mai mult tendința să se facă, în bună parte, o anumită descentralizare a laboratoarelor. În acest domeniu, s-au înregistrat în ultimii ani mari progrese prin obținerea unei game largi de „teste rapide" biochimie, bacteriologice și imunologice, permițînd executarea rapidă „la patul bolnavului" sau în „cabinetul de consultații" a unor analize de orientare, care de multe ori determină instituirea mai rapidă a unui tratament.

Aceste analize asigură totodată un triaj de laborator și descongestionează în parte laboratoarele mari centrale, menite să facă analize mai pretențioase.

La noi în țară, introducerea treptată a acestor „teste rapide" este încă la început. Există de asemenea tendința, în multe țări, de a cere clinicianului să se familiarizeze cu o serie de tehnici simple de laborator. În cazurile grave, este sigur preferabil să se obțină imediat o analiză chiar de valoare orientativă sau sugestivă, făcută de un cadru cu o practică de laborator mai redusă, dar conștiincios, care să cunoască totodată clinica bolnavului, decît să se obțină mult mai tîrziu un rezultat de mare precizie, care uneori în bolile supraacute, cu evoluție rapidă, nu mai are aproape nici o valoare.

În multe țări, cu mijloace mai reduse, se întîlnește uneori în mod invers, ambiția de a folosi numai cele mai sofisticate tehnici „la nivel mondial", în detrimentul analizelor simple, rapide și, după cum am mai spus, de o valoare de neînlocuit. De multe ori, o serie de informații, care nu sînt strict specifice, de valoare doar orientativă sau sugestivă, luate ca atare, pot deveni certitudini, dacă sînt coroborate cu informații epidemiologice și clinice. Din aceste motive, deși prezenta lucrare se referă la analize de laborator, am socotit util (sau chiar indispensabil) ca uneori să adăugăm unele referințe la clinică (la boli febrile, la evoluția clinică), la deosebirile ce trebuie făcute între un bolnav, o persoană infectată sau un purtător (eliminator sau neeliminator) de germeni, dar sănătos. Aceste deosebiri sînt foarte importante pentru bolnav și pentru medicul său tratant, dar nu pentru bacteriolog și, deseori, nici pentru epidemiolog, care deși folosesc în parte aceleași tehnici ca în laboratorul clinic, au alte sarcini și alte puncte de vedere.

Multe infecții se vindecă de la sine, dar uneori viața bolnavului depinde de un *diagnostic rapid*, care să permită aplicarea corectă a unui tratament adecvat. În aceste cazuri, orice oră pierdută pentru stabilirea diagnosticului poate costa viața bolnavului ; din această cauză, medicul tratant, în lipsa momentană a specialistului, trebuie chiar el neapărat și neîntîrziat, ziua sau noaptea, să poată executa rapid și corect unele examene simple, orientative și ușor de executat în laborator.

Sînt mii de agenți patogeni, specifici și nespecifici, sînt mii de boli, afecțiuni și tulburări organice posibile. Dintre miile de analize și investigații, care s-au imaginat deocamdată, vom căuta să alegem numai unele, mai ușor de executat, mai des utilizate și mai utile. Acestea trebuie neapărat cunoscute de orice clinician conștiincios (și cu atît mai

Scanned with OKEN Scanner

mult de medicul de laborator), fie pentru a le executa chiar el, la nevoie în cazuri urgente, fie pentru a-i învăța sau supraveghea pe colaboratorii și ajutoarele sale, și mai ales pentru a cunoaște și aprecia eventualele greșeli, care se pot face și care sînt limitele de fiabilitate tehnică și diagnostică a fiecăreia dintre ele.

Avantajele laboratorului minimal al clinicianului au fost expuse mai pe larg în paginile anterioare. Le rezumăm în iuțeală în stabilirea unui diagnostic prezumtiv și instituirea mai rapidă a unui tratament rațional, într-o serie de cazuri grave și urgente. Facilitează dialogul și sfătuirea reciprocă între clinician și specialistul de laborator și asigură un dublu control al analizelor (atît clinică-laborator și invers, cît și rezultatul analizei, încadrat în contextul clinic al bolnavului).

Dezavantajele constau, în primul rînd, în dificultatea de a înfrînge comoditatea și rutina comportamentului multora, de la personalul administrativ și ajutător și pînă la medicii clinicieni și de laborator. Pentru clinicieni, laboratorul minimal constituie, pe de o parte, un avantaj pentru bolnavi, dacă este folosit cum trebuie ; pe de altă parte, el constituie un dezavantaj personal, reprezentînd un spor de muncă și de învățătură. În sfîrșit, organizarea și funcționarea laboratorului minimal constituie o oarecare problemă organizatorică, care însă, cu un minimum de bunăvoință și de imaginație, se poate rezolva în mai toate unitățile sanitare.

Greșeli. Executarea și interpretarea unor analize, chiar elementare, de către clinicieni, expune la *erori* fie de execuție, fie de interpretare. Clinicienii însă *pot să învețe.* Ei își vor controla mereu tehnica de execuție a frotiurilor, a colorațiilor și a însămînțărilor, prin examinarea preparatelor și a culturilor, putînd astfel să-și dea seama, dacă ceea ce a făcut este sau nu utilizabil. Ei vor fi *controlați* de către medicii de laborator, dacă se respectă regula (ceea ce este obligatoriu) *ca orice lamă sau cultură, executată în clinică, să fie reexaminată de către medicul specialist de laborator,* care după caz va discuta cu clinicianul greșelile constatate, va repeta analiza, dacă este cazul, sau va executa în continuare identificarea agenților patogeni.

Clinicianul poate face greșeli în diagnosticul clinic și în tratamentul aplicat la bolnav, precum și în analizele elementare, pe care eventual le execută, dar pentru toate acestea el are răspunderea actelor sale, el poate fi îndrumat și format de cei cu mai multă experiență și și cu o calificare superioară.

★

Sperăm ca prezenta lucrare să constituie un pas înainte în concepția despre laboratorul clinic și un ajutor real în cunoașterea și îngrijirea cît mai rapidă și mai eficace a bolnavilor, evitînd totodată deseori eforturi și cheltuieli inutile, la nivelul laboratoarelor de înaltă specializare și înaltă tehnicitate.

Scanned with OKEN Scanner

1.2. PATOLOGIA INFECȚIOASĂ ȘI TENDINȚELE EI ACTUALE

Patologia infecțioasă, așa cum era cunoscută în trecut, era dominată de izbucniri epidemice de boli monoetiologice, specifice, de obicei imunizante. Unele boli erau special de omorîtoare, ca : variola, ciuma, holera, febra galbenă, tifosul exantematic etc.

Altele, deși mai puțin acute, erau de asemenea foarte de temut, ca : tuberculoza, lepra, malaria, febra tifoidă, dizenteria, tripanosomiaza etc. Grație creșterii standardului de viață, a măsurilor antiepidemice împotriva agenților patogeni, a imunizărilor active, a măsurilor împotriva vectorilor și a căilor de transmitere și grație izolării bolnavilor contagioși, aceste boli au devenit din ce în ce mai rare și chiar se poate întrevedea eradicarea multora din ele. Aceste succese răsunătoare au îndreptățit speranța, susținută mai ales de optimiștii mai puțin versați în patologia infecțioasă, că se va ajunge la lichidarea tuturor bolilor infecțioase.

Aceste păreri liniștitoare au avut însă și unele consecințe negative, privind orientarea cercetărilor, centrate pe agenții patogeni specifici, ca și asupra organizării sanitare, care s-a limitat aproape numai la informații și la combaterea numai a bolilor infecțioase specifice, contagioase, epidemice și imunizante.

— Activitatea curativo-profilactică a infecțiilor este grevată încă de următoarele 5 principale *concepții greșite*, din păcate adînc înrădăcinate în mintea unor medici și a populației :

a) „Infecțiile sînt în scădere" ! Afirmația este inexactă, deoarece patologia infecțioasă actuală este dominată de creșterea infecțiilor nespecifice, deseori plurietiologice, cu germeni oportuniști, a căror incidență întrece actualmente cu mult pe aceea a bolilor specifice imunizante, care singure sînt în scădere.

b) „Infecțiile au *întotdeauna* o etiologie specifică" ! Și această afirmație este inexactă.

c) „Diagnosticul infecțiilor, al complicațiilor și, adesea, și al bolilor se face numai prin laborator" ! De fapt, laboratorul confirmă doar o suspiciune epidemiologică sau clinică.

d) „Terapia infecțiilor și prevenirea complicațiilor septice și, deseori, chiar a bolilor se face numai prin antibiotice" ! De fapt, antibioticele sînt numai uneori indicate în cadrul complexului de măsuri terapeutice. Ele pot mijloci unele infecții și boli grave, necunoscute în trecut.

e) „Infecționiștii și epidemiologii, adică medicii specializați în recunoașterea și tratarea infecțiilor, ar trebui să se limiteze numai la combaterea bolilor cu (mare) potențial epidemic, care sînt în scădere marcată, lăsînd în schimb marea majoritate a bolilor care domină astăzi patologia infecțioasă, deseori nediagnosticate și netratate corect" ! Această atitudine este condamnabilă.

În secolul nostru, mai ales în țările cu un grad de civilizație avansat, s-au constatat schimbări substanțiale ale actualei patologii infecțioase, cu scăderea marcată a bolilor infecțioase specifice și imunizante, dar cu creșterea însemnată a bolilor infecțioase cu germeni nespe-

Scanned with OKEN Scanner

cifici, larg răspîndiţi în natură, la animale şi la om. Aceşti germeni de obicei nepatogeni şi bine toleraţi (saprofiţi), dar care pot profita de condiţii oportune (schimbarea ecologiei dintre germeni, în special graţie antibioticelor ; slăbirea macroorganismului prin defecte sau boli organice, traumatisme, manopere agresive, lezante sau penetrante medicale sau chirurgicale etc.), pentru a deveni patogeni. Practic, toţi germenii pot deveni în anumite condiţii patogeni, adică sînt *condiţionat patogeni* sau „oportunişti". Se întîlnesc, din ce în ce mai des, infecţii plurietiologice. Evoluţia şi simptomatologia bolilor este des atipică şi schimbătoare.

Cunoştinţele noastre asupra fiziopatologiei infecţiilor au făcut mari progrese, ceea ce ne-a făcut să înţelegem mai bine o serie de aspecte ale acestei patologii. În primul rînd, trebuie ca medicii clinicieni să facă deosebirea între prezenţa unor germeni pe tegumente şi mucoase, dar care sînt bine toleraţi, şi o *boală infecţioasă,* adică tulburarea bunei stări a macroorganismului, din cauza unor germeni patogeni (deci cauzatori de boală). Această deosebire nu este deseori, în mod suficient, luată în seamă de bacteriologi şi de epidemiologi. Noi ştim astăzi că boala infecţioasă este rezultatul interdependenţei a 3 grupe de factori : agenţii infecţioşi, macroorganismul şi mediul înconjurător. În fiecare din aceste 3 grupe, se disting numeroase fenomene, care pot influenţa rezultatul final fie într-un sens, fie într-altul (fig. 1).

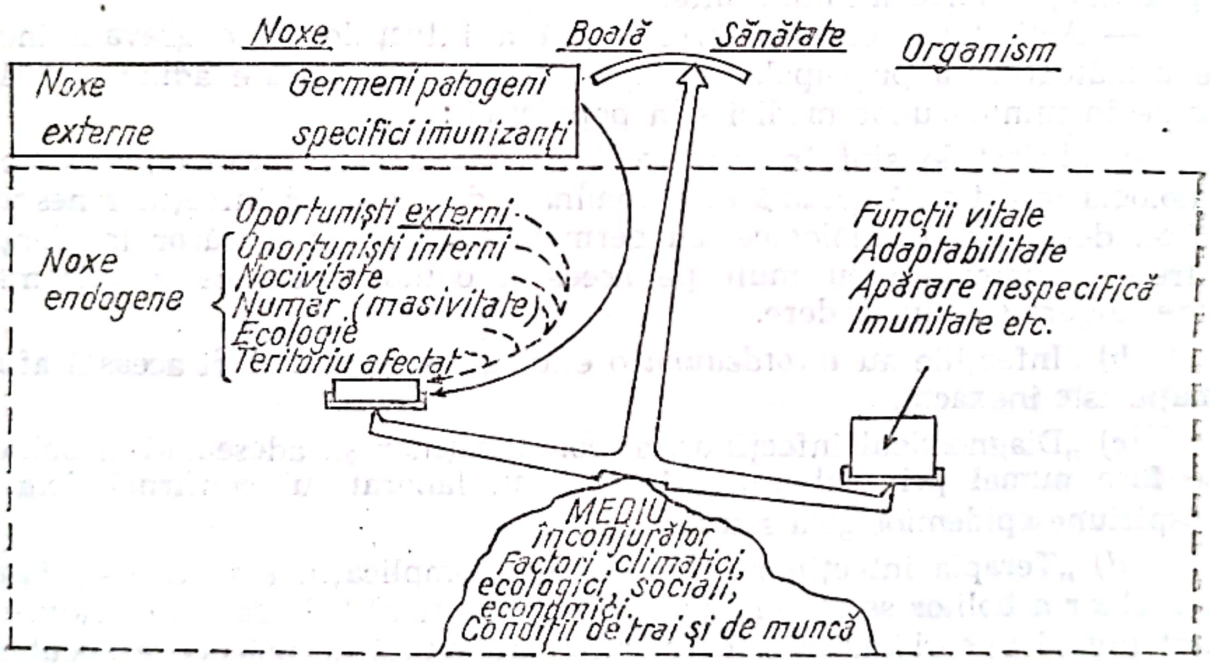


Fig. 1. — Cauze de îmbolnăvire infecţioasă. **În trecut, se luau în considerare numai noxele externe — germenii patogeni (în figură, aceste cauze sînt încadrate cu linie plină). În actuala patologie infecţioasă, domină o serie de alte cauze de îmbolnăvire infecţioase (în figură, aceste cauze sînt încadrate cu linie întreruptă).**

În fig. 1, în partea stîngă, se observă că, în afara germenilor specifici veniţi din afară (care în figură sînt încercuiţi cu o linie plină), mai pot veni din afară şi o serie întreagă de *germeni oportunişti* (în special germeni de spital, cu o agresivitate sporită şi des rezistenţi la antibiotice), care devin patogeni prin numărul lor mare (masivitatea

Scanned with OKEN Scanner

infecțiilor), prin schimbarea ecologiei dintre germenii convieţuitori sau prin faptul că potenţialul biologic al macroorganismului este deficitar (imatur, defecte imunologice, tratamente imunosupresive, defecte genetice, metabolice, boli organice, traumatisme, şoc, arsuri, bătrîneţe etc.).

O serie de germeni, chiar ai bolnavului, de pe tegumentele sau mucoasele sale, din saprofiţi bine toleraţi, pot deveni patogeni, cînd echilibrul biologic este tulburat, sau prin pătrunderea lor în teritorii şi ţesuturi, care de obicei sînt lipsite de germeni.

Tot în fig. 1, în dreapta, sînt ilustrate principalele cauze care ţin de macroorganism şi care se opun la infecţii. Slăbirea sau defecţiunea acestora duce la apariţia („aparent spontană") a infecţiei cu *oportunişti endogeni* (proprii germeni ai bolnavului) sau cu alţi *oportunişti exogeni*, veniţi din mediul înconjurător. În fine, în partea de jos a fig. 1, este reprezentat mediul înconjurător, care poate influenţa atît germenii, cît şi macroorganismul, prin factori climatici, nutriţionali, condiţii de trai şi de muncă, „stressuri" diverse, poluarea mediului, aglomeraţii umane mari, trafic intens şi rapid de populaţii, provenite din diferite regiuni ale pămîntului etc.

Pînă la începutul secolului nostru, nu se cunoşteau sau nu se luau în considerare decît germenii patogeni specifici veniţi din afară. Toate acţiunile antiepidemice erau îndreptate în această unică direcţie ; chiar şi acuma, această concepţie, care nu mai are de fapt decît o aplicabilitate eficace din ce în ce mai redusă, mai este menţinută prin tradiţii şi se oglindeşte în multe directive, dispoziţii şi regulamente sanitare în vigoare. Unii organizatori de sănătate, bacteriologi, epidemiologi şi clinicieni, impregnaţi de concepţiile din trecut, cer încă să se multiplice din ce în ce mai mult analizele şi culturile din scaune şi din exsudatele faringiene, căutînd să descopere agenţii patogeni specifici şi să le stabilească clasificarea taxonomică, cînd — din ce în ce mai mult — infecţiile actuale sînt determinate de unul din miile de agenţi, care se găsesc atît în lumea înconjurătoare, cît şi la însuşi bolnavul în cauză.

Nu se iau deseori în considerare (sau se minimalizează) variatele cauze de îmbolnăvire, care sînt indicate în fig. 1 şi care sînt îngrădite cu o linie punctată. Acestea sînt, de fapt, cauzele care domină actuala patologie infecţioasă.

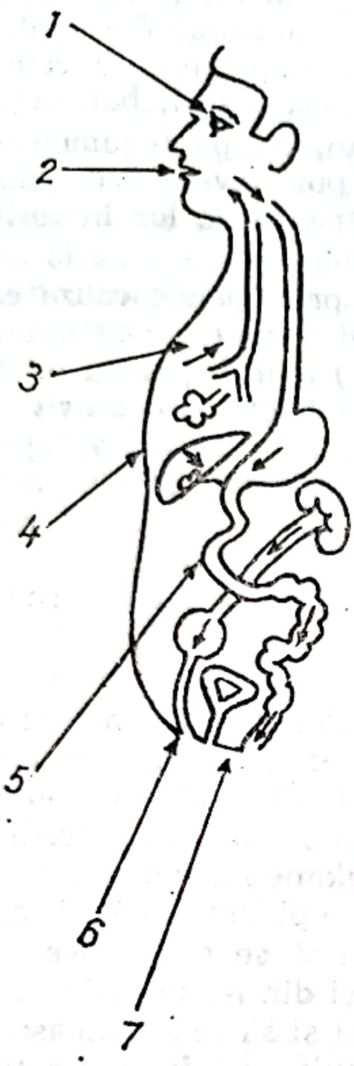
Flora normală. Corpul omenesc este populat, pe tegumente şi pe mucoase, şi adăposteşte într-o serie de cavităţi naturale un număr imens de germeni de foarte multe feluri, pe care, în mod normal, îi tolerează ca saprofiţi sau comensali „inocenţi". Organismul se apără de pătrunderea unor germeni din afară, printr-o serie de mecanisme fizice, chimice, enzimatice sau imunologice, precum şi prin echilibrul ecologic între diverşii germeni (fig. 2).

Trebuie menţionat că pot exista uneori şi germeni care pot persista în intimitatea ţesuturilor, fie perfect suportaţi, fie sub forma de infecţii latente sau lente. Printre aceştia, se numără : unele bacterii, unii paraziţi intracelulari, fungi, virusuri (virus herpetic, virus varicelozosterian, virus rubeolic, virus citomegalic, virusul hepatitei virale B, virusul Ebstein-Barr, virusuri lente şi, probabil, şi virusuri oncogene, cel puţin

978625

BIBLIOTECA JUDETEANA „GH.ASACHI" IASI

Scanned with OKEN Scanner



Saprofiţi „normali" condiţionat patogeni
Ordin de mărime al numărului lor pe ml (cm^2)
Peste 50% anaerobi în regiunile neaerate bine
Ochi 10^2-10^4
Nas 10^4-10^5
Gură 10^6-10^{11}
Trahee 10^2-10^4
Bronhii 10^2-10^3
Alveole $0-10$
Piele 10^3-10^6
Stomac 10^2-10^3
Căi biliare $10-10^3$
Jejun 10^2-10^4
Ileon 10^3-10^6
Colon 10^6-10^{12}
Rinichi $0-10$
Căi urinare $10-10^3$
Vagin 10^3-10^5
Rect 10^5-10^{12}
Perineu 10^6-10^{10}

Fig. 2. — Factorii normali antiinfecţioşi şi populaţia microbiană normală. Factori şi mecanisme de apărare antiinfecţioasă :

— *Factori locali : 1* — ochi (clipire, lacrimi, lizozim, IgAsa) ; *2* — nas, gură, căi respiratorii superioare (secreţii eliminate sau înghiţite, lizozim, echilibru ecologic al florei saprofite, IgAs) ; *3* — căi respiratorii inferioare (flux continuu de mişcare, de jos în sus, cili vibratili, macrofage, IgAs) ; *4* — piele şi mucoase (integritate anatomică, descuamaţie continuă, transpiraţie, secreţie de mucus, pH acid, echilibru ecologic al florei saprofite) ; *5* — tub digestiv (flux continuu din tubul digestiv şi din glandele anexe, pH acid în stomac, echilibru ecologic al florei saprofite) ; *6* — aparat urinar (flux continuu, pH acid) ; *7* — regiunea perineală (secreţii, pH acid, echilibru ecologic al florei saprofite).
— *Factori sistemici :* fagocite fixe şi circulante, sistem reticuloendotelial, imunitate tisulară şi umorală, „imunvigilenţă".

la unele animale). Toţi aceştia pot rămîne în stare latentă toată viaţa omului, sau se pot evidenţia printr-o transmitere verticală (de la mamă la copil) sau se pot „redeştepta", cu ocazia alterării funcţiilor organice (în special în cazul unor boli grave, cașectizante, neoplasme, sau în cursul unor tratamente imunosopresive pentru boli proliferative, în transplante de organe etc.).

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul I, sînt trecute principalele feluri de *germeni saprofiți* care se găsesc în diferite teritorii ale organismului uman adult, iar în tabelul II sînt trecuți *germenii patogeni* și acei *oportuniști*, care sînt mai des întîlniți în infecții.

Este important de semnalat faptul că această nouă „patologie" îmbracă tocmai în țările mai „civilizate" și mai bogate, aspecte îngrijorătoare, care nu mai pot fi nici ignorate și nici minimalizate. Trebuie, de asemenea, recunoscut faptul că o serie de aspecte negative privind sănătatea populației sînt consecința îndepărtată și indirectă a însăși progresului, a civilizației și a unor acțiuni medicale. Ușurarea condițiilor de viață, înlăturarea acțiunilor agresive ale mediului înconjurător, menținerea în viață a copiilor și a adulților cu boli, care erau înainte omorîtoare, înlăturarea unor germeni, care înainte produceau boli grave, lungirea duratei medii de viață, toate aceste acțiuni, cu rezultate imediate deosebit de valoroase, duc însă la scăderea potențialului biologic al omului civilizat, ale cărui posibilități de adaptare și apărare sînt mai limitate. Scade efectul selecției naturale, se produce un dezechilibru ecologic al microorganismelor, cu creșterea rolului germenilor oportuniști, care sînt cu atît mai agresivi cu cît acționează pe o populație mai mare de persoane, cu pontențialul biologic mai scăzut (imaturi, bolnavi, bătrîni etc.).

Vom da cîteva exemple: cu tot modul de trai „civilizat" și aplicarea regulilor igienico-sanitare „clasice" și a uzului larg de antibiotice, infecțiile postoperatorii în S.U.A. ating actualmente proporții mai mari ca în trecut sau ca în alte țări. Este drept că aceasta se datorește și faptului că se fac intervenții mai îndrăznețe, aplicate la bolnavi cu un potențial biologic mai scăzut, dar chiar pentru banala apendicectomie, infecțiile postoperatorii în S.U.A. depășesc larg 10% ! În S.U.A., din cele 30 de milioane de internări anuale în spital, 2 milioane contractează infecții cu germeni oportuniști, ceea ce are drept consecință un număr însemnat de pierderi de vieți omenești, cheltuieli spitalicești suplimentare de 500 milioane dolari anual, fără a socoti costul asigurărilor și al zilelor de muncă pierdute.

Uzul profilactic de antibiotice, departe de a da rezultatele scontate, mijlocește deseori apariția de infecții, prin tulburarea ecologiei bacteriene a germenilor oportuniști.

Patologia infecțioasă actuală (*boală infecțioasă patentă* sau *diferite infecții subclinice*). Este caracterizată printr-o serie de *tendințe evolutive* enumerate în continuare :

— *Descreșterea* treptată, dar substanțială, a *bolilor contagioase specifice și imunizante*. Scăderea și uneori chiar dispariția marilor epidemii și pandemii din trecut (gripa și hepatitele virale par să facă excepție).

Vechea clasificare a bolilor în contagioase și necontagioase, ca și acțiunea veche de izolare, sînt noțiuni care actualmente apar ca insuficiente, cu o eficacitate limitată, des îndoielnică, și uneori chiar dăunătoare, mai ales față de situațiile nou-apărute, prin înmulțirea bolilor infecțioase nespecifice. Chiar profilarea laboratoarelor centrelor sanitaro-antiepidemice (C.S.A.) și a unor laboratoare clinice, pentru urmărirea numai a infecțiilor specifice și a agenților lor patogeni, apare actualmente ca o acțiune cu totul insuficientă.

— *Creșterea* proporțională a *bolilor virale*, care deocamdată nu au putut fi stăpînite, a căror propagare este favorizată de creșterea populației și, mai ales, de formarea de aglomerații dense, de mișcările de populații și de înmulțirea contactelor între oameni.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

Principalii germeni și specii (Sp) saprofiți obișnuiți
Marea majoritate pot deveni patogeni („oportuniști") și pot contamina și falsifica produsele patogen și culturile examinate

Denumirea (în ordine alfabetică)	*Aspect**	*Coloraţie Gram*	*A* (aerob) *AN* (anaerob)	*Localizare obişnuită*					
				Nas	*Gură*	*Faringe*	*Tract digestiv*	*Genito-urinar*	*Piele Urechi Ochi*
Acinetobacter sp. (Mima, Herella)	B	Neg.	A mobil	+		+		+	
Achromobacter sp.	B	Poz.	A			+	+	+	
Actinomyces sp.	B	Poz.	AN		+	+	+		
Aeromonas sp.	B	Neg.	A				+		
Alcaligenes sp.	B	Neg.	AN				+		
Barillus sp.	B	Poz.	A		(+)		(+)	(+)	+
Bacteroides sp.	B	Neg.	AN		+	+	+	+	
Borrellia sp.	S	Neg.	micro-aerofili		+				
Branhamella (micro-coccus)	C	Neg.	A	+	+	+			+
Candida	L M	Poz.	A	(+)	+	+	+	+	
Clostridium sp.	B	Poz.	AN				+	+	
Corynebacterium sp.	B	Poz.	A (AN)	+	+		+	+	+
Entamoeba sp.	P				+		+		
Enterobacteriaceae sp.	B	Neg.	A		+	+	+	+	
Escherichia	B	Neg.	A				+	+	
Klebsiella	B	Neg.	A			+	+	+	
Proteus	B	Neg.	A				+	+	
Vibrio	V	Neg.	A				+		
Eubacterium	B	Poz.	AN		+		+	+	
Flavobacterium sp.	B	Neg.	AN				+		
Fungi (multe specii)	Variabil		A		+	+	+	+	+
Fusobacterium sp.	B	Neg.	AN		+	+	+	+	

Scanned with OKEN Scanner

Urmare tabelul 1

Haemophilus sp.	CB	Neg.	A	+	+	+		+	
Lactobacillus sp.	B	Poz.	AN		+		+	+	
Leptotrichia sp.	B	Neg.	AN		+				
Moraxella sp.	B	Neg.	A		+	+			+
Mycobacterium sp.	B	Acido-alcoolo-rezistent	A	+		+	+	+	+
Mycoplasma sp.	CB			+	+	+	+		+
Neisseria sp.	C	Neg.	A	+		+	+	+	+
Paraziți diverși	P H						+	+	+
Peptostreptococcus sp.	C	Poz.	AN		+	+	+	+	+
Propionibacterium acnes	B	Poz.	AN						+
Pseudomonas sp.	B	Neg.	A				+		
Staphylococcus aureus	C	Poz.	A						+
Staphylococcus epidermidis	C	Poz.	A	+	+	+		+	+
Streptococcus faecalis (enterococ)	C	Poz.	A	+	+	+	+	+	
Streptococcus pyogenes	C	Poz.	A		+				
Streptococcus viridans	C	Poz.	A		+	+	+	+	+
Spirochaeta sp.	S	Neg.	A		(+)		+		
Treponema	S				+		+	+	
Trichomonas	P	Neg.	AN		+		+	+	
Veillonella sp.	C	Neg.	AN		+	+			

* *B* — bacili; *C* — coci; *CB* — cocobacili; *V* — vibrioni; *S* — spirili; *L* — levuri; *M* — micelii; *P* — protozoar; *H* — helminți.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II

Principalii germeni (şi specii) patogeni şi condiţionaţi patogeni mai des întîlniţi în infecţii

Denumirea agentului patogen (în ordine alfabetică)	*Localizări mai frecvente* (în paranteză localizări mai rare)									
	Sistemice. Sînge Splină. SRE Metastaze oriunde	L.C.R. şi sistem nervos	Urechi Sinusuri	Ochi	Tract digestiv, anexe şi peritoneu	Tract genital şi anexe	ract urinar	Faringe, căi respiratorii superioare	Căi respiratorii inferioare (spută)	Plăgi. Tegumente Sist. osteo-articular
Acinetobacter sp.	+	+							+	
Actinomyces sp.	(+)	(+)			+					+
Achromobacter	(+)				(+)		(+)			+
Aeromonas sp.	(+)				(+)	(+)	(+)			+
Alcaligenes sp.	(+)	(+)					(+)	(+)		
Bacillus anthracis, *B. cereus*	+	+			(+)	+		(+)	+	+
Bacteroides sp.	+	+			+	+		+	+	+
Borrelia	+									
Brucella sp.	+					+			+	+
Bordetella (*Haemophilus*)								+	+	
Candida sp. şi diverşi fungi	(+)	(+)			(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Campylobacter sp.	(+)				(+)					
Chlamydia sp.	(+)			+		+		+	+	
Clostridium sp.		Toxină				+	+	(+)	(+)	+
Corynebacterium sp.		Toxină		+	+		(+)	+	(+)	+
Entamoeba histolytica		(+)				+			+	
Entamoeba sp.	+	+								
Enterobacteriaceae sp.	+	(+)	+		+	+	+	(+)	(+)	(+)
—*Escherichia coli*	(+)	(+)	+		+	+	+	(+)	(+)	(+)
—*Klebsiella*	(+)	(+)	+		+	+	+	(+)	(+)	+
—*Proteus*	(+)	(+)	+		+	+	+	(+)	(+)	(+)
—*Salmonella*	(+)	(+)	+		+	(+)		(+)		+
—*Shigella*					+					
Erysipelothrix (rujet)	(+)					+				+
Eubacterium										
Filaria sp.	+					(+)				
Flavobacterium	+	+								
Francisella tularensis	+	(+)			+				+	+
Fusobacterium sp.						+		+	+	
Giardia lamblia					+	+	(+)			
Haemophilus sp.	(+)	+	+	+				+		
H. influenzae									+	
H. pertussis (*Bordetella pertussis*)								+	+	

Continuare tabelul II

H. ducreyi						+				+
Histoplasma sp.	+	(+)							+	
Lactobacillus	(+)								(+)	
Leptotrichia						(+)		(+)		
Leishmania	+				+					+
Listeria sp.	+				+	+		+		
Malaria	+	(+)								
Moraxella sp.				+						
Mycobacterium tuberculosis și *M. leprae*	+	+	(+)	+	+		+	(+)	+	+(+)
Mycoplasma sp.	+					+		+	+	
Neisseria sp.	+	(+)		(+)		+				
N. gonorrhoeae	(+)	(+)		(+)		+	(+)			
N. meningitidis	+	(+)								
Peptococcus sp.	(+)									+
Peptostreptococcus sp	+									+
Pseudomonas sp.	+	+	+		+		+		+	+
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+		+		+		+	+
Pseudomonas mallei (morva)	+	+	+					+	+	+
Rickettsia sp.	+	+		+		(+)			+	
Staphylococcus aureus	+	+	+	(+)	+	+	(+)	(+)	+	+
Staphylococcus epidermidis	(+)	(+)	(+)		(+)					(+)
Streptococcus pyogenes	+	(+)	+			+		+	(+)	+
Streptococcus pneumoniae (pneumococ)	+	+	+	+				+	+	
Streptococcus faecalis (enterococ)	+	+	(+)		+	+	+		+	(+)
Streptococcus viridans	+									
Streptobacillus moniliformis	(+)	(+)								+
Spirillum sp.	(+)									
Spirochaeta sp.	+	(+)				(+)				
Treponema	+	+				+				+
Toxoplasma		(+)		(+)		(+)				
Trichomonas						+				
Veillonella sp.	(+)								(+)	
Yersinia sp.	+				+				+	
Yersinia enterocolitica	(+)				+					
Yersinia pseudotuberculosis	(+)				+				+	+
Yersinia pestis	+				+				+	+

Scanned with OKEN Scanner

— Din ce în ce mai des, se întîlnesc *boli plurietiologice,* infecţii mixte (de ex., virale şi bacteriene, bacterii aerobe şi anaerobe). Din ce în ce mai mult, se observă *boli multifactoriale,* prin însumarea concomitentă sau alternativă de factori, care izolaţi pot fi total nepatogeni sau care pot fi ajutători sau declanşatori de boală. Evoluţia şi simptomatologia bolilor şi a infecţiilor diverse este deseori atipică, înşelătoare sau schimbătoare, în bună parte, fie din cauza tratamentelor cu antibiotice, fie din cauza modificării ecologiei microbiene, fie din cauza modificării reactivităţii organismului.

— *Creşterea infecţiilor nespecifice şi neimunizante,* de obicei cu *germeni oportunişti.* Aceste infecţii, care domină actuala patologie infecţioasă, constituie probleme importante în colectivităţile de copii (case de naştere, creşe, cămine, grădiniţe, internate, şcoli, policlinici şi spitale de copii), precum şi în unităţi sanitare, în special în pediatrie, obstetrică-ginecologie, urologie şi alte specialităţi chirurgicale şi medicale. Aceste infecţii sînt foarte de temut în unităţile de terapie intensivă, de arşi, de transplante de organe, unde bolnavii internaţi au grave deficienţe biologice.

— *Infectarea endogenă,* cu proprii germeni din flora normală („saprofiţi"), dar condiţionat patogeni, a persoanelor cu potenţial biologic scăzut (imaturi, defecte imunologice, denutriţie, boli organice grave, stări de şoc, neoplasme etc.). Aceşti bolnavi pot, prin scăderea puterii lor de apărare, în special prin deprimarea imunităţii celulare, a macrofagelor tisulare şi a activităţii fagocitare, să ajungă într-o stare de areactivitate, de *anergie.*

Decelarea anergiei în clinică se poate face cel mai uşor prin teste intradermice de tip întîrziat (care traduc de fapt migrarea monocitelor, la locul unde s-a injectat antigenul). Se folosesc ca antigene acelea cu care marea majoritate a persoanelor au intrat în contact şi faţă de care ei răspund printr-o reacţie intradermică întîrziată. Astfel, se recomandă următoarele antigene purificate şi titrate : Trichophyton, Candida, streptokinază-streptodornază, derivat purificat de proteină de bacil Koch (P.P.D.) şi, eventual, şi de oreion, uneori şi fitohemaglutinină. Citirea reacţiei se face după 24 şi 48 de ore şi rezultatele se pot grupa în 3 categorii, astfel : reactivitate normală (cel puţin 2, deseori mai multe reacţii pozitive) ; anergie relativă (o singură reacţie pozitivă) ; anergie (nici o reacţie pozitivă). Există o relaţie strînsă între anergie, infecţii şi mortalitate, ceea ce justifică eforturile pentru depistarea şi corectarea ei prin suprimarea pe cît posibil a cauzelor.

La aceştia, proprii lor germeni saprofiţi pot deveni invadanţi, graţie unor manopere medico-chirurgicale agresive sau penetrante, graţie unor medicaţii imundepresive, graţie unei schimbări în ecologia microbilor conlocuitori, de obicei în urma unor tratamente cu antibiotice.

— *Apariţia de boli noi,* necunoscute în trecut, care sînt consecinţa unor acţiuni medicale, ca de ex. : infecţii mascate prin tratamente masive şi prelungite cu corticosteroizi, enterite stafilococice postantibiotice, candidoze sistemice postantibiotice, septicemii şi endocardite postcateterizare venoasă sau după intervenţii pe sistemul cardiovascular, infecţii cronicizate prin tratamente prelungite (dar neadecvate) cu antibiotice etc. Mai pot fi, eventual, socotite boli noi, acelea care sînt importate din alte regiuni ale globului, prin mişcări repetate şi rapide de persoane. Înmulţirea infecţiei cu virusul hepatitei B trebuie interpre-

Scanned with OKEN Scanner

tată ca o boală nouă sau cel puțin „tînără", sau este o boală veche, dar nerecunoscută în trecut.

— *Schimbarea ecologiei microbiene* în lumea înconjurătoare la animale și la om, prin utilizarea largă a unei multitudini de substanțe chimice (cosmetice, detergenți, pesticide, ierbicide etc.), dar mai ales prin utilizarea largă a antibioticelor în scopuri agroalimentare, veterinare și medicale. De asemenea, poluarea mediului înconjurător duce la o schimbare ecologică treptată a tuturor viețuitoarelor.

— *Înmulțirea tulpinilor microbiene și a paraziților rezistenți* la antibiotice, antiseptice și pesticide, contagiunea interbacteriană cu factori plasmidiali de rezistență la antibiotice, înmulțirea polirezistenței bacteriene la antibiotice, întreținută și întărită în totalitate prin contact cu oricare dintre antibioticele, care intră în spectrul de polirezistență. Toate acestea contribuie la schimbarea patologiei infecțioase și, mai ales, la alterarea răspunsului la tratament.

— *Schimbarea simptomatologiei și a tabloului clinic* în multe boli, care în ultimul timp se deosebesc din ce în ce mai mult de felul cum ele se manifestau în trecut. Aceasta se datorește fie reactivității schimbate a macroorganismului, fie schimbării agentului infecțios, fie bineînțeles și tratamentului aplicat, domeniu în care au apărut noi și importante posibilități de influențare a bolilor.

— *Zonele geografice de răspîndire naturală a unor boli* s-au modificat : unele s-au redus, altele s-au extins, grație traficului intens și rapid dintre diferitele regiuni ale globului.

— În unele țări, felul necivilizat de trai al unor tineri din țările „civilizate" expune la *creșterea actuală a unor infecții la toxicomani.*

Se notează, de asemenea, o creștere a unor boli care teoretic ar fi trebuit să fie mult îngrădite, ca bolile venerice și scabia, sau reapariția unor boli eradicate într-o regiune, prin importul ei dintr-o altă regiune (de ex., malaria).

★

Față de *noul aspect al patologiei infecțioase* și de *tendințele ei evolutive,* ar trebui făcute eforturi pentru o adaptare în consecință, nu numai pentru atitudinea noastră antiepidemică, dar și pentru învățămîntul medical, pentru cercetările științifice în laboratoarele de profil (bacteriologic, virusologic, parazitologic, micologic, seroimunologic, de anatomie patologică etc.), pentru profilul de lucru al laboratoarelor Centrelor sanitare antiepidemice (C.S.A.) și poate mai ales pentru laboratoarele clinice. Trebuie să se găsească soluții organizatorice și practice de depistare precoce și de urmărire a infecțiilor, indiferent dacă agentul în cauză este un germen patogen specific sau un germen oportunist. Trebuie să se poată, dacă este cazul, să se studieze sensibilitatea germenilor la substanțe antimicrobiene, iar în cazuri speciale, în cursul tratamentului, să se poată determina concentrațiile minime inhibitorii *in vitro,* nivelurile inhibitorii obținute la bolnavi, să se poată surprinde o eventuală instalare de rezistență sau o schimbare a florei, prin înlocuirea

Scanned with OKEN Scanner

germenului sensibil la tratament cu altul dintr-altă specie, rezistent la antibioticele utilizate.

Descentralizarea analizelor elementare, care se pot face la patul bolnavului sau în ambulatoriu, și acelea care se pot face într-un laborator minimal pe secție sau pe etaj, precum și profilarea mai bine adaptată a laboratorului central pe probleme de infecții, constituie, după părerea noastră, soluțiile care trebuie luate în considerare și realizate.

Sarcinile medicinii actuale. *Prevenirea bolilor* (nu neapărat prevenirea oricărei infecții subclinice) constituie teoretic sarcina și ținta supremă a medicinii. Pentru aceasta, trebuie să se cunoască cauza bolilor infecțioase (vezi și fig. 1) și neinfecțioase. Trebuie să se asigure o supraveghere epidemiologică a populației nu numai față de bolile contagioase specifice și imunizante, care în trecut dădeau naștere la mari epidemii, și față de bolile transmisibile de declarare obligatorie și de internare obligatorie (vezi *Bul. Ministerului Sănătății* nr. 1/1979), deoarece acestea sînt mult mai puțin frecvente și o parte din ele sînt și acuma mai puțin grave, dar mai ales față de toate celelalte boli care domină patologia actuală (boli cardiovasculare, digestive, respiratorii, alergice, neuropatii etc.) și din care infecțiile constituie o parte însemnată. Studiul cauzelor foarte complexe, care generează aceste boli, constituie o sarcină medicală de mare actualitate. Înlăturarea lor însă este o problemă a întregii societăți, care este singura care prin legi, organizații, noi orientări, educație de masă, informare și convingere etc. ar putea eventual modifica condițiile actuale de viață, responsabile de schimbarea și extinderea bolilor care actualmente sînt în creștere.

Patologia actuală este de cele mai multe ori *multifactorială* și generată, direct sau indirect, de condițiile de trai în familie, în colectivitățile de copii și tineret, de condițiile de alimentație, de muncă, de poluarea mediului înconjurător, de stress-urile și tensiunea nervoasă, de intensitatea preocupărilor la care sînt supuși mulți oameni, de unele deprinderi ca fumatul, abuzul de băuturi alcoolice, uzul de stupefiante (în țările „civilizate" ale Occidentului) etc.

Aglomerările, iuțeala și intensitatea traficului au și ele un rol important în apariția și în dezvoltarea actualei patologii.

A persista în ideea că prevenirea bolilor poate fi realizată numai prin acțiuni medicale constituie, credem, cea mai gravă greșeală, care compromite sănătatea populației și ea traduce de fapt fie ignoranța, fie reaua credință, fie incapacitatea, fie fuga de răspundere.

În trecut, preocuparea primordială a clinicienilor era tratarea bolnavilor, apoi stăvilirea răspîndirii bolilor și prevenirea lor. Ulterior, ei s-au străduit să afle cauza bolilor, să studieze agenții patogeni și să-i depisteze în colectivitate și la bolnavi. În ultimele decenii, studiul agenților patogeni a făcut foarte mari progrese. Prioritatea preocupărilor s-a inversat, adică pentru mulți medici studiul cel mai amănunțit al unor germeni a devenit preocuparea prioritară, apoi studiul răspîndirii lor în societate în scopul prevenirii bolii, iar îngrijirea bolnavilor tinde să rămînă pe ultimul plan. Această tendință era justificată, deoarece multe boli infecțioase se vindecau (sau nu) de la sine, terapia antiinfecțioasă fiind deseori inoperantă ; era deci logic să se studieze agentul

patogen specific, pentru a preveni apariția bolii. De altfel, această atitudine a dat roade deosebit de valoroase în prevenirea multor boli specifice imunizante.

Studiul germenului patogen, ca preocupare primordială, a dus de multe ori la tendința de a neglija deosebirea dintre prezența de germeni patogeni tolerați, de saprofiți și de germeni condiționat patogeni, pe de o parte, de starea de infecție și starea de boală (adică suferința bolnavului), pe de altă parte.

Orientarea antiepidemică centrată pe agentul patogen era în bună parte justificată, atunci cînd patologia infecțioasă, așa cum se cunoștea atunci (și cum și astăzi o mai consideră marele public și o parte din medicii neinformați) era dominată de infecții specifice, determinate de anumiți germeni, despre care se credea că sînt totdeauna patogeni, adică capabili să producă boli, deseori grave și transmisibile.

Actualmente, grație progreselor științei și a măsurilor sanitaro-antiepidemice, numărul bolilor specifice, transmisibile, de obicei imunizante, a scăzut foarte mult. Acest succes este întărit și menținut, grație unei continue vigilențe antiepidemice.

Astăzi, în lupta antiinfecțioasă, activează 3 feluri de medici, aparținînd unor specialități medicale bine distincte, dar cu multe puncte comune și cu o interajutorare indispensabilă, și anume : microbiologii (cercetători științifici ai agenților patogeni și potențial patogeni) ; epidemiologii (cu laboratoarele lor profilate în consecință), care asigură vigilența antiepidemică și caută să prevină infecțiile specifice de mare răspîndire posibilă ; medicii clinicieni, care trebuie să se preocupe de bolnavii lor și care, indiferent de specialitatea lor medicală sau chirurgicală, trebuie să poată recunoaște și să poată trata corect (eventual, în colaborare cu infecționiștii) infecțiile care pot surveni. În această acțiune, laboratorul clinic, mai ales dacă este bine orientat în această direcție, este de cel mai mare ajutor și, actualmente, nu ne putem dispensa de el.

Tratarea bolnavilor. Tratarea bolnavilor constituie de fapt preocuparea zi de zi pentru marea majoritate a medicilor. Din totalitatea bolnavilor, mai ales în patologia infantilă, în specialități chirurgicale și în secțiile de terapie intensivă, o proporție însemnată, care poate varia între jumătate și peste trei sferturi, o constituie infecțiile, și anume fie infecțiile primitive, fie secundare și, nu rareori, iatrogene. Dacă ne gîndim la numărul mare de bolnavi care primesc antibiotice, atunci ne dăm seama că afirmația de mai sus nu este deloc exagerată. Uneori, aceste infecții sînt relativ benigne, cu o simptomatologie minoră, alteori însă ele pot fi deosebit de grave.

Patologia infecțioasă actuală trebuie să implice o schimbare în atitudinea noastră medicală. Infecțiile nespecifice se întîlnesc în toate domeniile specialităților medicale și medico-chirurgicale și, deși nu îmbracă forma marilor epidemii din trecut, numărul lor per total depășește cu mult pe acel al bolilor specifice din listele bolilor transmisibile de internare obligatorie și de declarare obligatorie, luate la un loc.

În toate aceste cazuri, în care deseori reactivitatea organismului este aceea care determină un germen potențial patogen să producă o boală, medicul tratant trebuie să studieze boala (suferința organismului)

și să caute s-o trateze prin diverse mijloace, inclusiv antiinfecțioase nespecifice și specifice, etiotrope dacă se poate.

Pentru conducerea tratamentului în bune condiții, medicul este obligat să se sprijine pe un diagnostic, fie doar prezumtiv, fie de preferință bine precizat. De multe ori, el este obligat să recurgă la unele analize pentru precizarea diagnosticului bolii și, eventual, pentru recunoașterea agentului infecțios, implicat în etiologia bolii.

Diagnosticul infecțiilor și valoarea analizelor de laborator. Diagnosticul nu trebuie considerat ca un scop în sine, el trebuie să contribuie la înțelegerea bolii și la instituirea unui tratament, la lămurirea unor probleme științifice, antiepidemice, să îndeplinească un rol statistic sau să sprijine unele investigații epidemiologice și de profilaxie. Diagnosticul bolii este util clinicianului pentru instituirea și conducerea tratamentului.

Investigațiile trebuie să cuprindă 3 tipuri de informații : despre *bolnav*, adică terenul pe care se desfășoară boala ; despre *boală*, adică suferințele și tulburările organice, metabolice, de homeostazie, neurovegetative etc., prezentate de bolnav ; despre *agentul cauzal* (eventualii agenți, care contribuie sau care au declanșat boala).

Diagnosticul etiologic al bolii, numele agentului patogen în cauză nu reprezintă decît o etapă, nu neapărat obligatorie în lupta împotriva bolii. Deseori, se poate trata o boală infecțioasă, fără să se cunoască clasificarea taxonomică a agentului în cauză. Diagnosticul etiologic poate însă, deseori, să motiveze instituirea și conducerea tratamentului și să fie un factor de prognostic. El poate fi necesar din motive statistice, antiepidemice, administrative și birocratice.

Din primul și pînă în ultimul contact cu bolnavul, medicul trebuie mereu să raționeze și să analizeze mintal diversele posibilități de diagnostic. El va îndrepta interogatoriul și investigațiile în vederea conturării lor. El va prescrie apoi acele analize, care îndepărtează unele suspiciuni sau — dimpotrivă — întăresc altele, sau chiar va cere o analiză țintită, care poate confirma etiologia bolii.

Clinicianul conștiincios, după o anamneză amănunțită, luînd în considerație (dacă este cazul) unele date epidemiologice, în urma unui istoric amănunțit, cu eșalonarea cronologică a fenomenelor clinice (și eventual de laborator) survenite, după un examen clinic atent și corect, trebuie să fie în măsură să se orienteze asupra unor tulburări organice sau metabolice survenite la bolnav și asupra unor posibilități etiologice. El se va gîndi mai întîi la ceea ce este mai frecvent (criteriu statistic). Dacă apar mai multe boli de același fel în aceleași condiții, este probabil să aibă o cauză comună (criteriu epidemiologic). Anamneza, istoricul și clinica permit de multe ori, dacă nu să ajungem totdeauna la un diagnostic complet, cel puțin să orientăm direcțiile prioritare ale investigațiilor paraclinice și de laborator pentru precizarea diagnosticului.

În așteptarea acestora, sau chiar în lipsa lor, clinicianul va putea de obicei începe un tratament, bazat pe un raționament logic și pe prezumții statistic valabile.

Pentru a lămuri și completa diagnosticul, în scopul nemijlocit de a fi în folosul bolnavului, se va recurge la o serie de investigații para-

Scanned with OKEN Scanner

clinice și de laborator, eșalonate în funcție de urgență și de aportul practic pe care îl pot aduce. Curiozitatea științifică, analizele sofisticate pentru precizări fiziopatologice, determinări taxonomice foarte departe conduse etc. vor fi lăsate pe planul al doilea în laboratoarele clinice (sau vor fi predate altor laboratoare mai specializate), deoarece toate acestea sînt în general laborioase, scumpe și pretențioase și, în plus, ele dau deseori un răspuns tardiv și nu sînt decît uneori în folosul practic al bolnavului. Executarea de la bun început a unor largi baterii de analize, cum sînt practicate deseori, mai ales în țările bogate, sînt uneori mai puțin justificate din punct de vedere medical-curativ pentru bolnavul în cauză, adică cu speranța de a asigura un anume tratament, cît mai degrabă au un interes științific sau statistic și pot servi la ameliorarea ulterioară a tratamentului în cazuri similare.

Folosirea seturilor de analize prezintă însă o serie de avantaje : sînt ușor de utilizat, dau rezultate de obicei precise și asigură reproductibilitatea analizelor. Ele au inconvenientul că depind de o industrie producătoare sau provin din import și pot scumpi prețul de cost per bolnav.

Dacă largile baterii de analize („toate analizele"!) sînt în general de condamnat, se recurge însă des la unele analize de „screening", de triaj, sau am putea spune de „filtre diferențiale", pentru renunțarea la o serie de analize care devin inutile și pentru a îndepărta cercetările ulterioare în direcțiile cele mai promițătoare, în vederea instituirii corecte a tratamentului.

Aceste analize de screening nu vor fi totdeauna aceleași, dar adaptate la bolnavul în cauză : puține analize la o boală ușoară, ușor de diagnosticat la un tînăr cu stare generală bună ; mai multe, dacă starea generală este modificată, dacă diagnosticul este greu de stabilit și dacă bolnavul prezintă pe lîngă semnele de infecție (aspect care ne preocupă în special în lucrarea de față), semne sau o bănuială de suferințe organice, metabolice, de homeostazie etc.

În privința sindroamelor de tip infecțios este important de lămurit, dacă este vorba de o *infecție bacteriană* (care actualmente se poate des trata cu succes) sau de o *infecție virală* (față de care de obicei nu există un tratament etiotrop) sau de un *sindrom febril „post infecțios"*, cu substrat imunologic de tip reumatism articular acut, sau de o *afecțiune de sistem*, o „boală de colagen", sau de o *boală febrilă neinfecțioasă* (febră de resorbție, febră medicamentoasă, „boala serului", neoplasm febril etc.).

Pentru cunoașterea și tratarea infecțiilor se poate recurge la mai multe feluri de analize. Valoarea lor informațională și domeniul lor de aplicare sînt foarte variate. Ele ar putea fi grupate, în mod cu totul schematic, artificial și teoretic, în 4 categorii, ale căror limite de încadrare nu pot fi considerate rigide. În prima grupă, ar intra toate analizele care sînt utile, indiferent de cauza bolii ; următoarele își îngustează domeniul de aplicabilitate, pe măsură ce se restrîng investigațiile, pentru a ajunge pînă la urmă la diagnosticul etiologic (tabelul III). Trebuie să reamintim, o dată mai mult, că — în interesul bolnavului — nu intere-

Scanned with OKEN Scanner

sează totdeauna diagnosticul etiologic, ci tratamentul şi prognosticul suferinţelor sale şi, de fiecare dată cînd este posibil, vom începe de-a dreptul cu ultima etapă, aceea care, prin investigaţie ţintită, asigură diagnosticul etiologic şi justifică instituirea unui tratament adecvat.

Tabelul III

Etapele diagnosticului în infecţii
(simptom → sindrom → afecţiune → boală → infecţie → etiologie)

Scop — indicaţii	*Investigaţii şi tehnici*	*Utilitate practică*
La toţi bolnavii: explorarea terenului (organismului) şi a suferinţelor sale	Examen clinic complex Examen radiologic, biochimic, hematologic etc. Controlul metabolismului şi al hemostazei Probe funcţionale pe sisteme (inclusiv imunitar) etc.	Deseori duc la intervenţii terapeutice, indiferent de agentul cauzal Uneori, descoperiri de afecţiuni asimptomatice
La toţi bolnavii febrili (poate infecţii sau afecţiuni inflamatorii, semne de activitate şi evoluţie): infecţii, boli de sistem, afecţiuni cu substrat imunitar, neoplasme febrile etc.	*Examen clinic* Termometrizare Leucograma (examen morfologic sanguin) Viteza de sedimentare a eritrocitelor Proteina C reactivă Dozări de complement şi de IgG, IgM	Nespecific Aprecierea activităţii evolutive, mai ales în boli subacute şi cronice
Infecţii foarte probabile Semne orientative sau sugestive de infecţie	Leucogramă Citologie, histopatologie Evoluţia Ig (G şi M)	Contribuie la diagnosticul diferenţial (prezumtiv) al afecţiunii bacteriene sau virale etc.
Analize care duc la diagnosticul etiologic	Vizualizare, izolare, cultivare, identificare de agent patogen Punerea în evidenţă de produsele lui specifice (antigen, toxine) Creşterea semnificativă a anticorpilor specifici Antibiogramă	Asigură diagnosticul etiologic Contribuie la alegerea tratamentului etiotrop

Mulţi oameni cred (şi chiar unii medici de specialitate îngustă îşi închipuie) că o analiză de laborator, o radiografie sau un traseu electrocardiografic asigură, în mod neîndoios, diagnosticul bolii şi, eventual, şi cauza îmbolnăvirii. De cele mai multe ori, acestea nu fac decît să confirme sau să precizeze o suspiciune clinică. Diagnosticul nu poate fi pus decît prin confruntarea raţională a tuturor datelor epidemiologice, clinice, paraclinice şi de laborator. Nici o analiză luată izolat nu poate hotărî un diagnostic. De ex., o spută cu bacili acidoalcoolorezistenţi sau o hemocultură cu bacili tifici, dacă pacientul în cauză nu suferă de nimic care să sugereze o tuberculoză pulmonară sau o febră tifoidă, dacă examenul clinic şi celelalte investigaţii paraclinice sînt negative în aceste direcţii,

Scanned with OKEN Scanner

indică de obicei o greșeală, fie de recoltare, fie o confuzie de produs sau de buletin sau de interpretare.

Orice analiză, indiferent de felul ei, nu are nici o valoare sau chiar poate fi dăunătoare, prin inducerea în eroare, dacă oriunde pe parcursul operațiilor, care s-au succedat, de la indicații și recoltare și pînă la emiterea buletinului final, s-a produs o greșeală. Trebuie să se acorde o deosebită atenție recoltării, transportului și conservării produsului patogen, deoarece aceste puncte sînt prea des încredințate unui personal insuficient calificat. *Trebuie să ne asigurăm că în toate cercetările microbiologice, agentul examinat este acela care a pricinuit boala și nu este altul, un „conviețuitor inocent".*

În toate neconcordanțele dintre clinică și laborator, trebuie ca medicul clinician și medicul de laborator să analizeze în comun cauzele posibile ale neconcordanței, deoarece fiecare din ei are partea sa de responsabilitate, primul în recoltare, ultimul în execuția analizei și emiterea buletinului. Din nefericire, din lipsă de timp, din comoditate și cîte odată dintr-un fel de orgoliu rău înțeles, fiecare se mulțumește deseori să acuze pe celălalt, în loc să colaboreze pentru lămurirea cazului în interesul bolnavului.

Se întîmplă, uneori, ca un medic de laborator să aibă o bună reputație de specialist pe singurul motiv că a făcut mii și mii de analize de același fel. El poate fi considerat ca bun specialist, numai dacă a practicat regulat un control de calitate în laborator și dacă s-a făcut o bună concordanță între laborator și clinică. Altfel, este posibil, și din păcate s-au văzut (este drept rareori) asemenea cazuri, ca toate analizele să fie făcute necorespunzător.

Deosebit de grav, este faptul că, uneori, nimeni nu sesizează eroarea gravă care se poate strecura. Astfel, medicul tratant emite un buletin de cerere de analiză, recoltarea se face poate incorect, transportul, conservarea, executarea analizei și emiterea buletinului pot prezenta fiecare în parte o serie de surse de eroare și, în sfîrșit, clinicianul primește buletinul de analiză cu rezultatul respectiv și își formulează diagnosticul și tratează bolnavul. Toată lumea este mulțumită, deoarece nimeni nu-și pune probleme și pe nimeni „nu-l doare capul". Noroc că un diagnostic corect sau incorect nu influențează mersul bolii, și de asemenea noroc că multe boli se vindecă (și din nenorocire altele nu se vindecă), indiferent de tratamentul aplicat ! În toate cazurile grave și des recuperabile (septicemii, endocardite, meningite etc.), însă, orice greșeală poate costa viața bolnavului. Din această cauză, întregul flux de operații, care se succed în executarea unei analize, în emiterea și în interpretarea cu simț critic a unui buletin, trebuie continuu supravegheat cu mare simț de răspundere. Executarea în dublu, sub număr de cod, a aceleiași analize este cel mai simplu control de calitate, iar repetarea analizelor, departe de a fi un lux, este indispensabilă în toate afecțiunile cu evoluție rapidă (boli acute, boli infecțioase etc.).

Diagnosticul infecțiilor subclinice și al purtătorilor, (aparent) sănătoși sau convalescenți, constituie o preocupare a epidemiologilor și a

Scanned with OKEN Scanner

laboratoarelor C.S.A. Diagnosticul bolilor cade însă în sarcina clinicienilor și a laboratoarelor clinice.

Teoretic, diagnosticul se face pe rînd între bolile infecțioase și bolile neinfecțioase, apoi între infecțiile bacteriene și infecțiile nebacteriene, și în sfîrșit, între diversele infecții bacteriene, pe de o parte, și infecțiile cu rickettsii, cu chlamidii, cu micoplasme, cu virusuri, cu paraziți sau cu fungi, pe de altă parte. Toate aceste investigații, larg desfășurate, sînt laborioase, costisitoare și de lungă durată.

În practică, de foarte multe ori, indicațiile clinice și paraclinice sînt suficient de sugestive pentru a sări unele din etapele citate mai sus și pentru a îndrepta cercetările, în mod țintit, către un anumit grup de agenți patogeni sau chiar către unul anume.

Uneori, o simplă întrebare este suficientă, pentru a face inutile o serie de analize laborioase. Citățm două cazuri de infirmare de variolă : o bolnavă cu erupție varioliformă, la întrebarea de cînd a ieșit erupția, răspunde că aceasta a apărut de 2—3 luni ; un copil nevaccinat antivariolic deoarece avea eczemă, prezintă o boală foarte asemănătoare cu variola, apărută după ce a dormit în pat cu un alt copil proaspăt vaccinat antivariolic.

În orice caz, se vor practica cele trei grupe de examene minimale de laborator și anume : un examen sumar dar complex de sînge, un examen de urină și un examen al produsului patologic provenit din țesuturile bolnave.

Recomandăm să se evite practicarea mecanică de la început a unei largi baterii de analize, dar să se recurgă de preferință la unele examene de triaj, de „screening", limitat față de sindromul clinic prezentat de bolnav ; se va putea astfel face un „screening" hematologic pentru tulburări de coagulare, un „screening" biochimic pentru tulburări hepatobiliare, la bolnavii cu icter, un „screening" microbiologic în cazuri de angine, tulburări digestive (în special diaree), în sindromul meningian, în septicemii, în endocardite etc.

În funcție de datele clinice, de evoluția bolii, de datele paraclinice și de rezultatele preliminare orientative de laborator, clinicianul va completa, va diversifica sau va reorienta investigațiile, pentru a putea institui la nevoie un tratament, care — eventual — va fi reconsiderat sau adaptat pe parcurs. Se vor evita cercetările de lux, cercetările de curiozitate, care reprezintă timp, materiale, efort și cheltuieli, fără să fie nemijlocit în folosul bolnavului în cauză.

1.3. LABORATORUL DE ANALIZE MEDICALE

1.3.1. OBSERVAȚII PRELIMINARE

Progresele științei și dezvoltarea cunoștințelor medicale au fost determinate, în bună parte, de noi și variate metode de investigare. Pe măsură ce se fac noi progrese, se naște însă necontenit necesitatea de a se imagina și de a se recurge la noi și noi și din ce în ce mai perfecționate metode și tehnici de analize. Acest proces, care se desfășoară

progresiv în lanţ, duce la creşterea rapidă a numărului de analize, depăşind capacitatea obişnuită de lucru, de spaţiu, de aparatură şi de personal de laborator, chiar şi în cele mai înzestrate şi bogate unităţi sanitare. Într-o revistă de specialitate medicală din S.U.A., a apăruţ o caricatură care ilustrează această situaţie (fig. 3). Pentru a face faţă acestei situaţii s-au desprins următoarele două tendinţe de dezvoltare : pe de o parte, recurgerea treptată la o mică mecanizare şi apoi la automatizarea analizelor curente, care trebuie executate în serii mari în laboratoarele centrale, dar care implică o structură dependentă de industria producătoare de reactivi şi care nu este rentabilă decît numai dacă numărul analizelor de acelaşi fel este relativ mare ; pe de altă parte, s-a dezvoltat şi extins utilizarea de analize rapide, de valoare orientativă, care nu necesită nici o aparatură specială şi nici o tehnicitate deosebită şi care pot fi executate de orice medic, în mod descentralizat, fie la patul bolnavului, fie în cabinetul de consultaţii, fie într-un mic punct de laborator cu o înzestrare minimală (un microscop*, o centrifugă, şi cîţiva coloranţi şi reactivi).

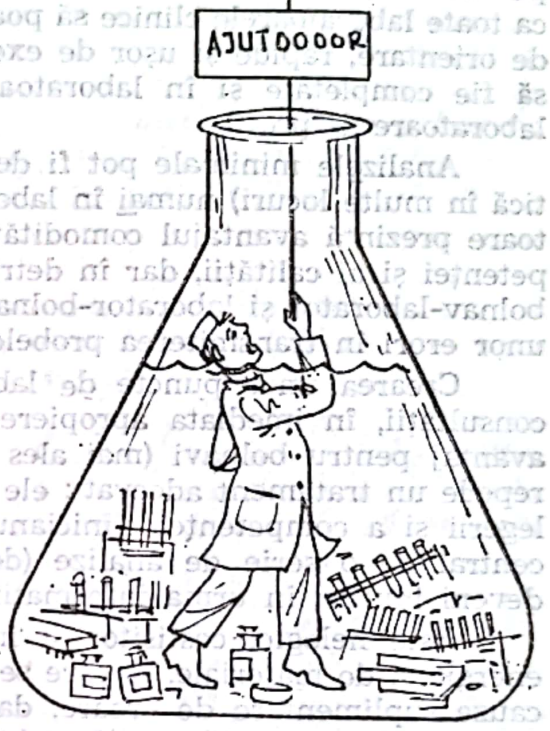


Fig. 3. — Specialist de laborator înecat în noianul analizelor.

Lăsînd la o parte analizele mai pretenţioase, care se execută în laboratoarele centrale şi de specialitate sau de referinţă, în general bine cunoscute, bine puse la punct şi executate conform unor tehnici standard, ne vom ocupa în prezenta lucrare numai de examenele curente, elementare, uşor accesibile şi care ar trebui executate oriunde se pune problema descoperirii, studierii şi tratării unei infecţii.

Laboratoarele medicale sînt profilate în funcţie de sarcinile pe care le au de îndeplinit şi de competenţa care le incumbă, în raport cu categoria unităţii sanitare respective.

Laboratoarele clinice au un profil de muncă mult deosebit de acela al laboratoarelor de acţiune antiepidemică, de igienă, sau de profil îngust, ca acelea de microbiologie, parazitologie, virusologie, micologie etc. Chiar şi laboratoarele clinice vor fi şi ele, în oarecare măsură, profilate diferenţial, în funcţie de analizele mai frecvent cerute şi care diferă în parte, după cum lucrează pentru o policlinică, pentru o secţie de pediatrie,

* Este mult mai economic şi mai eficace procurarea citorva microscoape simple, decît a unui microscop de cercetare scump, care nu poate fi utilizat decît de o singură persoană şi care de obicei nu foloseşte toate posibilităţile acestui instrument.

pentru una de obstetrică-ginecologie, pentru una de chirurgie sau de alte specialități chirurgicale, pentru una de terapie intensivă etc.

Întrucît problema infecțiilor, care se încadrează în actuala patologie, afectează toate aceste diferite secții și nu numai, cum se credea pe vremuri, secțiile de boli contagioase cu germeni specifici, este necesar ca toate laboratoarele clinice să poată executa o serie de analize minimale de orientare, rapide și ușor de executat, urmînd ca, de la caz la caz, ele să fie completate și în laboratoarele centrale mai bine utilate sau în laboratoare de profil.

Analizele minimale pot fi desigur executate (după cum se și practică în multe locuri) numai în laboratoarele mari centrale. Aceste laboratoare prezintă avantajul comodității (practice și administrative), al competenței și al calității, dar în detrimentul rapidității și a legăturii dintre bolnav-laborator și laborator-bolnav. În plus, mai prezintă în parte riscul unor erori în transmiterea probelor și a informațiilor.

Crearea unor puncte de laborator pe secții sau la cabinetele de consultații, în imediata apropiere a bolnavilor, constituie neîndoios un avantaj pentru bolnavi (mai ales pentru cei gravi), care pot primi mai repede un tratament adecvat ; ele asigură creșterea cunoștințelor, a înțelegerii și a competenței clinicianului și, în fine, degrevează laboratorul central de o serie de analize (deseori laborioase și scumpe), care pot deveni inutile, în urma informațiilor orientative obținute imediat.

Este nelogic, costisitor și implică o pierdere inutilă de timp, de energie și de materiale, la care se adaugă probleme de transport și unele cauze suplimentare de eroare, dacă analizele care se pot executa rapid „la patul bolnavului" sau „în cabinetul de consultații", fără nici o aparatură specială și care nu necesită nici o tehnicitate deosebită, sînt executate departe de bolnav, într-un laborator central, eventual chiar într-altă clădire, mai mult sau mai puțin îndepărtată.

Dacă problema amplasării, dotării și ierarhizării laboratoarelor este grea, ea totuși se poate rezolva cu oarecare efort și perseverență ; în schimb, problema cadrelor de laborator este mult mai dificilă.

Ar fi de dorit ca medicii de laborator clinic să-și lărgească orizontul cunoștințelor și al preocupărilor lor, pentru a deveni ceea ce în unele țări se cheamă „patologist". Prea deseori, se face greșeala și confuzia între un anume profil, spre pildă microbiologia, virusologia, parazitologia etc., luate ca știință, și ceea ce trebuie să fie laboratorul clinic, al cărui scop este în primul rînd de a fi în folosul bolnavului. Greșeala este tot atît de mare ca atunci cînd s-ar confunda știința botanică cu agrotehnica. Scopul, preocupările și profilul de lucru sînt și trebuie să fie diferite în laboratoarele de cercetare științifică de bacteriologie, în acelea ale laboratoarelor C.S.A. și ale laboratoarelor clinice, deși deseori folosesc în parte unele tehnici comune de lucru. Ele trebuie însă să colaboreze și să se ajute între ele.

Pe lîngă faptul că medicii de laborator clinic sînt puțini, ei nu au o formație de bază de „patologiști", adică de înțelegere și cunoaștere a patologiei, în general, pentru a putea servi de legătură și sfătuitor, atît

Scanned with OKEN Scanner

pentru clinician, cît și pentru cadrele de laborator cu profil îngust. Personalul de laborator are tendința de a se limita din ce în ce mai mult la un profil de lucru din ce în ce mai îngust, mărind necontenit cererea de noi cadre, care însă pierd legătura directă nu numai cu bolnavul, dar chiar și între diversele subspecialități de laborator.

Este nelogic, costisitor și reprezintă o risipă de capital prețios, ca un cadru de înaltă calificare (fie el clinician, fie personal de laborator) să fie obligat să-și utilizeze timpul de lucru cu ocupații care nu cer calificarea pe care o are.

Dorința de a putea face toate analizele imaginate (și în continuă creștere) nu poate fi realizată, și aceasta doar în parte, decît în mari laboratoare centrale, departe de unitățile sanitare mai mici și de realitățile și particularitățile bolnavilor.

1.3.2. ORGANIZAREA ȘI IERARHIZAREA UNITĂȚILOR SANITARE (INCLUSIV A LABORATOARELOR), CU FIXAREA COMPETENȚELOR ȘI EȘALONAREA ANALIZELOR MEDICALE

Rezolvarea practică a problemelor curativo-profilactice și de investigații a putut fi soluționată, în primul rînd, prin măsuri organizatorice, cu fixarea sarcinilor și a competențelor diverselor unități. Ele sînt subordonate unei ierarhizări sistematice și bine precizate. O asemenea ierarhizare trebuie să cuprindă și sectorul laboratoarelor, în cadrul cărora se pot imagina : *puncte mici de laborator, laboratoare de secție* sau *de etaj, laboratoare centrale de spital, laboratoare de specialitate* (C.S.A., laboratoare de microbiologie, virusologie, parazitologie, hematologie, imunologie etc. etc.) și *laboratoare* sau *institute de înaltă competență* sau referință pentru anumite probleme.

Fixarea în mod prea rigid a competențelor nu este întotdeauna de dorit, deci pot exista unele situații locale particulare, fie datorate profilului de lucru, fie datorate înzestrării laboratorului și a priceperii medicului de laborator.

Avînd în vedere că o parte din analize (și de multe ori unele analize deosebit de prețioase ca valoare informativă) se pot executa pe loc, la patul bolnavului sau în camera de consultații, se naște întrebarea pînă unde trebuie să meargă centralizarea și dacă nu este cazul să se facă în parte o oarecare descentralizare.

Dacă se adoptă, precum este logic, o ierarhizare a competențelor în unitățile sanitare, este normal să se adopte și o *eșalonare a analizelor medicale.* Analizele cele mai simple, mai ușor de executat fără o aparatură specială, se pot executa rapid și pe loc, fie la patul bolnavului, fie în cabinetul de consultații. Alte analize, de asemenea ușor de executat, dar care necesită un minimum de aparatură (centrifugă, microscop și cîțiva reactivi, teste rapide, benzi de hîrtie-test), pot fi executate în puncte de laborator, amplasate pe secții sau pe etaje. Analizele care cer o mai mare competență vor fi executate într-un laborator central sau în laboratoare de înaltă specialitate sau de referință.

Scanned with OKEN Scanner

Centralizarea totală sau descentralizarea parțială a analizelor medicale, așa cum este înțeleasă în multe unități din diferite țări și cum o preconizăm și noi, are fiecare avantaje și dezavantaje, iar rezolvarea judicioasă depinde de la caz la caz, de condițiile locale și de etapele de dezvoltare a laboratoarelor, precum și de încadrarea și valoarea profesională a celor ce lucrează analizele.

Avînd în vedere că infecțiile se ivesc în mai toate serviciile, indiferent de specialitate (adică peste tot unde se prescriu antibiotice), și că deseori depistarea și urmărirea infecției, în vederea luării de măsuri de combatere, au un caracter de urgență, preconizăm înființarea unor puncte de laborator, a căror amplasare și dotare trebuie atent studiată. Aceste puncte trebuie să fie cît mai aproape și mai accesibile de locul de recoltare a produselor patologice și ușor accesibile clinicianului.

Noi preconizăm următoarele eșalonări :

— *Eșalonul I* este situat la patul bolnavului sau în cabinetul de consultații, analizele fiind executate chiar de medicul clinician. O bună parte din analizele de orientare se pot executa rapid, pe loc, în completarea examenului clinic (fig. 4). Pentru executarea acestora, trebuie un minimum de bunăvoință și de inițiativă din partea medicului tratant și o serie redusă de materiale, care pot încăpea într-o trusă portativă sau pe o tavă adusă la fața locului. Trusa (sau tava) cuprinde materiale pentru examinare, materiale de recoltare și seturi de reactivi pentru reacții simple, rapide, de orientare.

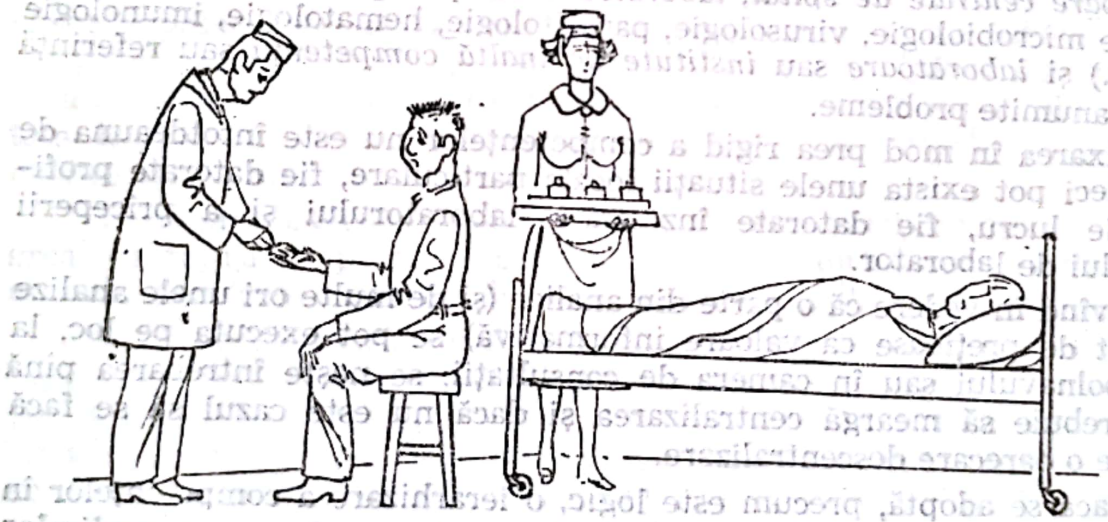


Fig. 4. — Eșalonul I (la consultație, gardă, salon sau pat) : teste rapide.

— *Eșalonul al II-lea* este reprezentat de un *laborator minimal* (fig. 5), care în forma cea mai redusă, începe pe o masă, plasată în apropierea bolnavilor, eventual în camera de gardă sau în camera surorilor. Înzestrarea acestui laborator este simplă, redusă, dar întocmită cu grijă. Acest laborator nu are de executat decît cîteva *analize de orientare*, ca : examen sumar de sînge, examen sumar de urină, examene sumare (și în special morfotinctoriale microscopic) ale produse-

lor patologice. Chiar şi aceste numai cîteva analize sumare vor fi făcute (sau de preferinţă şi în primă urgenţă) numai în cazurile-problemă, în cazurile grave sau de urgenţă *. Laboratoarele minimale trebuie în plus să fie capabile să execute corect o serie de prelevări de produse patologice pentru examene ulterioare, care se vor executa fie pe loc, fie într-un laborator central, fie în laboratoare speciale de profil. O serie de prelevări de materiale patologice, care prezintă unele particularităţi tehnice (puncţii medulare, puncţii şi biopsii ganglionare, hepatice, pleurale, puncţii în focare cu o floră anaerobă etc.) trebuie executate cu instrumente şi materiale, care se vor afla fie la laboratorul central, fie de asemenea la acest laborator minimal (vezi şi cap. 3).

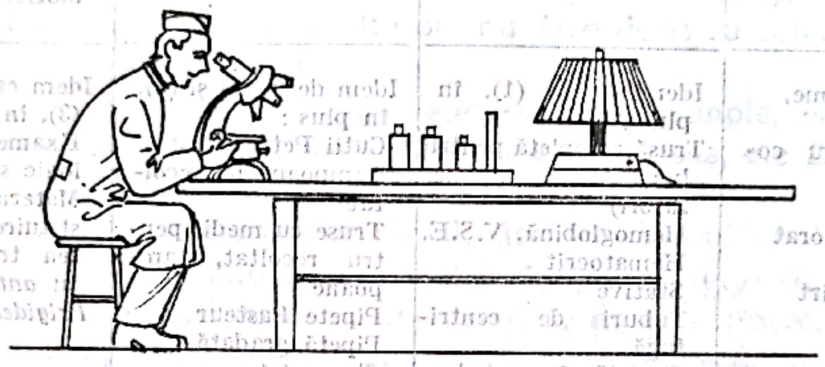


Fig. 5. — Eşalonul II sau *laboratorul minimal:* analize simple, orientative.

Pe măsura posibilităţilor, acest laborator minimal va fi suplimentat cu un frigider şi un termostat şi aprovizionat cu medii de cultură, tuburi, eprubete şi cutii Petri. În felul acesta, el poate rezolva şi o serie de probleme, legate de o eventuală antibioticoterapie a cazurilor grave sau a cazurilor-problemă (septicemii, endocardite şi alte infecţii grave).

Înzestrarea acestui laborator minimal va putea fi redusă, sau suplimentată după nevoi şi posibilităţi (vezi tabelul IV).

Amplasarea acestui laborator minimal ridică probleme deosebite. El trebuie să se afle sau să fie improvizat în imediata apropiere a bolnavilor şi uşor accesibil medicului tratant, pe secţie sau pe etaj sau în camera de gardă. Această amplasare pe secţie sau pe etaj este indispensabilă, atunci cînd laboratorul central se află la distanţă, uneori chiar în altă clădire sau în alt cartier al oraşului! Amplasarea corectă a laboratorului minimal în preajma bolnavilor este uneori greu de realizat din diferite motive obiective, dar cu perseverenţă şi bună înţelegere trebuie să se ajungă la o soluţie acceptabilă.

Laboratorul minimal este uneori confundat şi cuprins în secţia de urgenţă a laboratorului central, ceea ce are marele dezavantaj de a pierde legătura cu clinica şi cu medicul tratant, îngreuind mult confruntarea bilaterală între clinică şi laborator.

* În cazurile banale, unde nu se pune problema urgenţei, aceste analize sumare pot fi făcute în laboratorul central.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul IV

Propuneri pentru înzestrarea laboratoarelor minimale

(1) *Masă mică* (cca 700/450 mm)	(2) *Masă medie* (cca 900/450 mm)	(3) *Masă mare* (cca 1500/750 mm)	(4) *Punct de laborator complex*
Microscopie Hematologie Morfologie bacteriană și parazitară Citologie Teste rapide la bolnav	Idem ca la (1), în plus Examen sumar de : Sînge Urină L.C.R.	Idem ca la (1) și (2), în plus : Diverse produse patologice Însămînțări Examene biochimice foarte sumare	Idem de la (1), (2) și (3), în plus : Examene microbiologice sumare Examene pentru instituirea tratamentelor cu antibiotice
Microscop, lame, lamele Stativ pentru coloranți Eprubete Baie de colorat Apă neutră Lampă de spirt	Idem ca la (1), în plus : Trusă completă pentru hematologie (numărători) Hemoglobină, V.S.E. Hematocrit Stative Tuburi de centrifugă *Centrifugă* cu balanță de echilibrat Stativ tip pentru reactivi	Idem de la (1) și (2), în plus : Cutii Petri Tampoane de recoltat Truse cu medii pentru recoltat, tampoane Pipete Pasteur Pipetă gradată *Termostat*	Idem ca la (1), (2) și (3), în plus : Examen microbiologic sumar Materiale pentru instituirea și conducerea tratamentului cu *antibiotice* *Frigider*

Activitatea în laboratorul minimal cere din partea medicului bunăvoință, conștiinciozitate și un minimum de manualitate, care poate fi dobîndit de oricine. Este de dorit ca analizele simple, elementare, dar de mare valoare orientativă să fie făcute, în cazurile-problemă și în cazurile urgente, de cel care îngrijește bolnavul în cauză (în completarea examenului clinic), de medicul de gardă, de intern sau de medicul de secție, așa cum se și practică de fapt în multe țări din lume *.

* În funcție de posibilitățile financiare și de încadrare, în aceste laboratoare minimale mai poate lucra un tehnician (asistent de laborator sau laborantă) sau mai degrabă o soră sau asistentă de îngrijire a bolnavilor, cu program dirijat, în care caz volumul de lucru și varietatea analizelor se pot extinde.

Scanned with OKEN Scanner

La noi în țară, imensa majoritate a clinicienilor, absorbiți și uneori depășiți de activitatea lor administrativă, gospodărească nemedicală și medicală, dar mai ales din lipsa unei formații și a unei tradiții corespunzătoare, nu găsesc nici timpul și nici interesul să se ocupe cu acele puține analize minimale cerute de cazurile grave și de cazurile-problemă, ale căror beneficiari ar trebui să fie chiar ei, care au sarcina de a asigura o îngrijire cît mai bună bolnavilor. Noi credem că ar fi necesară o reorientare educativă și organizatorică a cadrelor în această direcție. Practica a arătat că este de obicei preferabil să se obțină un rezultat rapid, printr-o analiză de orientare (care nu cere o tehnicitate deosebită), chiar executată de un clinician fără mare experiență, dar conștiincios, decît un rezultat tardiv (care uneori nici nu mai este de actualitate), executat la cel mai înalt nivel și care de multe ori nu face decît să întărească sau să precizeze suspiciunea clinică.

În privința analizelor curente, elementare și simple, care pot fi executate în primele două eșaloane menționate mai sus, ele fac de fapt subiectul prezentei lucrări.

Întreținerea laboratorului minimal, dacă ar trebui să funcționeze ca o unitate de sine stătătoare, ar ridica desigur o serie de probleme foarte greu de rezolvat (probleme de personal de întreținere, probleme de înzestrare și aprovizionare etc.). Dacă el funcționează, însă, cum se întîmplă în unele țări, ca un „satelit" al laboratorului central, atunci toate problemele acestea se simplifică mult. În acest caz, laboratorul minimal este aprovizionat (la nevoie zilnic) de către laboratorul central, care va furniza materialele consumabile, reactivii, mediile, coloranții etc. De asemenea, laboratorul central va asigura sterilizarea materialelor septice, spălarea, pregătirea și sterilizarea tuburilor, a pipetelor etc.

— *Eșalonul al III-lea* este reprezentat de *laboratorul central.* Acest laborator trebuie să fie în măsură de a rezolva *marea majoritate a analizelor,* pe principalele profiluri de laborator : microbiologie clinică, parazitologie, micologie, virusologie, serologie, imunologie, hematologie, biochimie, citologie, anatomie patologică etc. Laboratorul central trebuie să folosească tehnici bine verificate, standardizate, capabile să asigure calitatea și reproductibilitatea analizelor. Metodologia și tehnica acestor analize, care sînt bine descrise în tratate, în lucrări de specialitate și în fișe tehnice de metode standardizate, nu se încadrează în lucrarea de față.

În funcție de eșalon, de ierarhizarea laboratorului central, de profilul unității (unităților) sanitare respective, el va fi profilat și dotat în raport cu competența care îi revine. Ceea ce depășește competența sau posibilitățile unui laborator clinic central, va fi trecut la un eșalon superior, la un laborator specializat (de ex., C.S.A.) sau la centre de înaltă competență, institute sau laboratoare de referință.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.3. RESPONSABILITĂȚILE ȘI SARCINILE PERSONALULUI MEDICAL (IN CLINICI ȘI IN LABORATOR) IN PRIVINȚA ANALIZELOR MEDICALE

Sarcini comune. Clinicianul și medicul de laborator clinic trebuie să cunoască și să aplice corect atît la bolnav, cît și în laborator, *tehnica aseptică* privind diferitele manipulări de produse patologice. Ei trebuie să fie familiarizați *cu rutina elementară de laborator:* manipularea corectă a obiectelor curate, sterile, murdare, infectate, manipularea ansei și a pipetelor, a tuburilor, a eprubetelor, a cutiilor Petri etc. ; echilibrarea cupelor de centrifugă și centrifugarea, executarea corectă de frotiuri, colorații uzuale, manipularea microscopului etc.

Ei trebuie să cunoască și să *poată executa corect cele 3 tipuri de examene minimale* complexe, care sînt totdeauna obligatorii (examene de sînge, de urină și examenul morfotinctorial al produselor patologice) și să le cunoască erorile posibile.

Aceste cunoștințe sînt necesare, pentru a le putea executa la nevoie, pentru interpretarea lor cu simț critic, pentru a putea instrui pe alții și, mai ales, pentru a putea supraveghea și controla, în mod competent, lucrul ajutoarelor lor, însărcinate cu unele manopere.

O serie de sarcini și manopere trebuie încredințate unui personal ajutător, care va avea o conștiinciozitate și manualitate superioară. *El va avea responsabilitatea executării corecte a acestor manopere.* Instruirea și supravegherea lor cade însă în sarcina medicilor clinicieni și medicilor de laborator clinic.

În sfîrșit, clinicienii și medicii de laborator clinic trebuie, în mod periodic și oricînd este nevoie, să poarte discuții de colaborare, interajutorare și de informare reciprocă, fie inițiate de unii, fie de ceilalți, și aceasta în toate cazurile grave și care prezintă probleme nerezolvate sau în cazurile în care există discrepanțe între clinică și laborator, precum și în cazurile în care, fie clinica, fie laboratorul observă fenomene sau rezultate aparent paradoxale sau inexplicabile.

Pe lîngă sarcinile comune ale clinicienilor și ale medicilor de laborator clinic semnalate mai sus, fiecare dintre aceștia au sarcini și responsabilități speciale.

Sarcinile și responsabilitățile clinicianului. Clinicianul are obligația de a alege *orientarea* și *ierarhizarea judicioasă a investigațiilor,* în funcție de caz, de urgența și de gravitatea lui și de posibilitățile unei intervenții terapeutice, justificate de rezultatul unei analize și, eventual de implicații epidemiologice-antiepidemice, și anume :

— Clinicianul alege *momentul, locul* și *tehnica* corectă pentru *recoltarea produsului patologic,* ceea ce este deosebit de important în toate cazurile unde există riscul de a nu se recolta un produs reprezentativ sau cînd există riscul unei contaminări a produsului cu o serie de germeni neimplicați în procesul patologic studiat.

— Clinicianul întocmește *buletinul de cerere de analiză,* care va cuprinde, în afară de identitatea bolnavului, la nevoie ora recoltării și incidentele care eventual s-au produs, care ar putea compromite corectitudinea rezultatului, precum și (eventual) suspiciunea clinică și epidemiologică.

Scanned with OKEN Scanner

— Clinicianul va semnala dacă bolnavul respectiv este *urgent (U), grav (G)* sau *caz-problemă (P).*

— Clinicianul trebuie să asigure *corectitudinea recoltării şi a transportului,* în timp util şi în condiţii bune (dacă produsul a fost conservat, cît timp, în ce condiţii şi dacă s-a utilizat un conservant şi care anume). El va semnala, la nevoie, pentru produsele microbiologice, dacă bolnavul a luat antibiotice şi care anume.

— Clinicianul *va colabora* eficace şi pe etape cu medicul de laborator clinic în cazurile grave şi atunci cînd este necesar pentru obţinerea cît de curînd a unor rezultate parţiale, dar orientative pentru conducerea tratamentului. Vor discuta împreună, dacă produsul examinat poate fi considerat reprezentativ şi dacă unele situaţii particulare ar putea modifica rezultatul analizelor.

— Clinicianul va anunţa laboratorul de îndată ce o analiză în curs de executare a devenit inutilă prin evoluţia sau lămurirea cazului, pentru a evita o pierdere inutilă de timp, de materiale şi de muncă. Va cere analize de control numai acolo unde este necesar, de obicei analize ţintite mai degrabă decît un evantai mare desfăşurat de analize. El se va interesa pe parcurs de rezultatul (eventual parţial) al analizelor cerute urgent. Cererea urgentă a unei analize dar neurmărirea ei, indică de obicei fie o neglijenţă, fie lipsă de simţ de răspundere din partea clinicianului.

— Clinicianul trebuie să se îngrijească de *informarea* lui *ştiinţifică,* pentru a putea cere introducerea unor noi şi superioare metode de investigaţie, care ar putea înlocui avantajos ceea ce este perimat şi depăşit.

Este surprinzător şi regretabil de constatat cu cîtă uşurinţă unii clinicieni aplică un tratament bazat pe o analiză eronată sau nesemnificativă, de a cărei eroare este chiar el responsabil, din cauza unei recoltări incorecte făcută chiar de el sau de unul din ajutoarele sale, cu cîtă uşurinţă se aplică un tratament bazat pe o antibiogramă, fără să se ia în considerare nici clinica şi nici factorii care ar putea face inutilă antibiograma respectivă.

Sarcinile şi responsabilităţile medicului de laborator clinic. Întrucît prima operaţie (şi din această cauză hotărîtoare) este *recoltarea corectă* a produsului de examinat, *transportul* şi eventual *conservarea* lui corespunzătoare, este necesar de a se stabili în mod ferm cine trebuie să facă, pentru diversele analize, recoltările, eventual frotiurile şi însămînţările primare, precum şi transportul în condiţii şi timp corespunzător de la bolnav la laborator. Trebuie stabilit sub controlul şi responsabilitatea cui trebuie să se facă acestea.

În funcţie de alcătuirea şi de organizarea unităţii sanitare şi în funcţie de felul analizelor, controlul şi responsabilitatea trebuie să revină, de la caz la caz, fie asupra clinicianului, fie asupra medicului de laborator, dar în nici un caz nu trebuie lăsate la voia întîmplării, pe mîna unui personal neinstruit sau necontrolat sau chiar pe seama bolnavului.

Recomandăm călduros ca acei care au făcut frotiuri sau însămînţări pe medii solide (sau în cutii Petri) să controleze chiar ei rezultatele

Scanned with OKEN Scanner

obținute, adică să examineze la microscop preparatul colorat sau cultura crescută după incubație, deoarece numai așa își vor da seama de corectitudinea manoperelor făcute de ei și de posibilitatea de a folosi frotiurile sau culturile făcute, sau dimpotrivă dacă acestea sînt inutilizabile. Numai așa, ei își vor putea controla calitatea muncii lor și își vor putea eventual ameliora tehnica în viitor, dacă ea a fost defectuoasă.

— Medicul de laborator clinic va face, pe cît posibil, controlul dacă produsul provine într-adevăr din focarul infecțios și care este valoarea lui reprezentativă (în special pentru spută, urină, biopsii etc.). Va executa, în primul rînd, *examenul morfologic* macroscopic și microscopic al produsului nativ sau/și colorat, urmărind în același timp aspectul *calitativ, cantitativ* și *proporțional* al tuturor elementelor figurate : celule, germeni etc. și felul lor (vezi cap. 2).

— Medicul de laborator va trage *concluzii provizorii* indicative sau prezumtive, care vor fi aduse la cunoștința clinicianului, deoarece acestea ar putea orienta tratamentul în unele cazuri urgente. Lamele cu frotiuri colorate se vor păstra cel puțin 48 de ore, pentru eventuale confruntări, sau vor fi puse la colecție.

— După caz, se fac în continuare *cercetări biochimice, seroimunologice* și *culturale*. Dacă se evidențiază morfologic sau se dezvoltă în *culturi* germeni, medicul de laborator clinic, după un examen microscopic morfotinctorial, va semnala aceasta de îndată clinicianului și, după caz, în cazuri de urgență, în cazuri-problemă și în cazuri grave (de ex., septicemii, endocardite, meningite etc.) va cerceta (la cererea clinicianului sau și din interes științific și uneori și epidemiologic) sensibilitatea acestor germeni la antibiotice *(antibiogramă)*. În aceste cazuri, germenii izolați se păstrează în laborator încă 10—20 zile, pentru cercetări de control sau cercetări complementare. Ulterior, germenii vor putea fi identificați taxonomic sau/și trimiși în laboratoare de profil sau de referință.

Este surprinzător și regretabil de constatat cu cîtă ușurință unii medici de laborator sînt dispuși să piardă timp și material cu culturi, identificări și antibiograma unui germen, fără să fi examinat în prealabil produsul la microscop, ceea ce le-ar fi permis deseori să recunoască că produsul nu este semnificativ și că germenul studiat de ei, foarte probabil (sau sigur) nu putea fi implicat în infecția în cauză.

— Medicul de laborator clinic va veghea la *corecta executare a analizelor* și va face periodic *controale de calitate* ale analizelor executate.

Fiabilitatea unei analize (adică măsura în care se poate avea încredere în ea) este o noțiune care trebuie cunoscută nu numai de medicul de laborator, dar în special de clinician.

Argumentul că cineva a făcut mii de analize nu înseamnă că le-a și făcut bine, dacă nu are *dublu control : controlul de calitate în laborator și controlul prin confruntarea cu clinica.*

— Medicul de laborator trebuie să *colaboreze*, în mod strîns, atît cu clinicianul, cît și cu diverși alți specialiști de laborator, cînd aceasta se impune.

Scanned with OKEN Scanner

În cazuri urgente grave şi în cazuri-problemă, medicul de laborator trebuie să anunţe pe parcurs pe clinician de rezultatele parţiale obţinute. El va propune clinicianului, dacă este cazul, alte tehnici sau noi investigaţii pentru ameliorarea diagnosticului, discutînd uneori despre oportunitatea alegerii unei analize sau a alteia.

Continua confruntare între laborator şi clinică, mai ales în investigaţiile morfologice, culturale şi serologice-imunologice, va duce la continua creştere a calităţii muncii, de care principalul beneficiar va fi bolnavul (şi un aport important pentru medicul tratant) şi va permite recunoaşterea din timp şi evitarea unor greşeli, care pot avea cele mai grave consecinţe.

Toate aceste obligaţii şi responsabilităţi trebuie bine cunoscute şi mai ales respectate.

— Executarea practică a recoltărilor şi a transportului trebuie, de la caz la caz, să fie încredinţată unui *personal ajutător*, cu condiţia expresă ca acesta să aibă *conştiinciozitatea* şi *tehnicitatea* corespunzătoare. De prea multe ori, aceste operaţii importante sînt lăsate pe seama oricui, uneori chiar a bolnavului ! Unele analize nu cer pentru recoltare nici dexteritate şi nici mare pricepere, ci doar conştiinciozitate, ca de exemplu urina pe 24 de ore, recoltare de scaun. Altele însă sînt mai pretenţioase ; astfel, recoltarea corectă a urinei din mijlocul jetului urinar, mai ales la femei, necesită un instructaj precis, conştiinciozitate şi respectarea întocmai a manoperelor prescrise. Recoltarea corectă a sputei pune, de asemenea, o serie de probleme şi nu trebuie lăsată pur şi simplu la fantezia unor bolnavi necooperanţi. Recoltarea sîngelui venos necesită o oarecare dexteritate, tubajul duodenal mai necesită şi răbdare, iar o serie de alte recoltări, ca lichid cefalorahidian, puncţii diverse, biopsii, precum şi recoltări pentru unele analize speciale, trebuie făcute neapărat de către medic, unele de clinician, altele de medicul de laborator. Toate recoltările şi însămînţările de produse patologice, pentru examene culturale, necesită conştiinciozitate, aplicarea riguroasă a tehnicii aseptice şi o oarecare manualitate. Este necesar ca în toate serviciile, în special acelea de copii şi în specialităţile chirurgicale şi de reanimare, să fie asigurată recoltarea, executarea corectă a unor frotiuri şi a unor însămînţări corespunzătoare, atît la patul bolnavului, cît şi în sala de operaţie sau de pansamente. Clinicianul şef de serviciu şi cu medicul de laborator clinic au datoria organizării optime a acestei probleme.

— Cazurile grave impun deseori *executarea rapidă a unor analize* elementare de orientare, pentru începerea urgentă a unui tratament. Amînarea nejustificată a acestor analize, ca şi amînarea abuzivă a intervenţiilor de urgenţă, constituie greşeli profesionale grave. Prima greşeală, neexecutarea, amînarea analizelor (mai ales dacă clinicianul ştie şi poate să facă analiza necesară), sub pretextul lipsei unui medic specialist de laborator, o considerăm *nescuzabilă*, deoarece analiza executată de clinician poate fi oricînd repetată şi controlată de medicul de laborator. Dacă însă ea nu a fost executată din timp, se pot pierde ore preţioase şi uneori chiar viaţa bolnavului. Exemplul de la subsolul pag. 82 este edificator.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.4. INZESTRAREA LABORATOARELOR

Teoretic, laboratoarele ar trebui astfel înzestrate încît să poată executa analizele cerute. Deseori, însă, analizele sînt limitate la posibilităţile existente. Introducerea de analize sau de tehnici noi superioare şi înlocuirea acelora depăşite întîmpină mari dificultăţi, fie din motive obiective, fie birocratice, fie doar din inerţie. Este de notat că dacă progresul prin introducerea de noi tehnici, de noi aparate şi de noi analize mai bune şi mai sofisticate se face cu greu, prin depăşirea unor multiple piedici birocratice, de planificare şi de inerţie la toate nivelurile (inclusiv din partea unor clinicieni şi a unor medici de laborator), aceasta afectează în special laboratorul central, complex, multiprofilat, dar mult mai puţin pentru înzestrarea eşalonului I şi de asemenea pentru eşalonul al II-lea, pe care-l numim „laboratorul minimal", care are nevoie doar de o înzestrare mult mai modestă şi care este (sau poate fi) la îndemîna marii majorităţi a unităţilor noastre sanitare.

Este drept că analizele efectuate în *eşalonul I*, care nu necesită nici o aparatură, care folosesc teste rapide şi care se pot executa în cabinetul de consultaţii, în camera de gardă sau la patul bolnavului şi care furnizează rapid indicaţii orientative privind starea organismului, ar mai putea fi îmbogăţite şi diversificate, prin introducerea de noi teste rapide.

Testele rapide au început să fie introduse la noi în reţea în ultimii ani. Adresabilitatea lor este foarte largă şi cuprinde aproape totalitatea bolnavilor. Pentru executarea testelor rapide, este uneori nevoie de cîteva lame de sticlă, chibrituri, vată, alcool, eventual cîteva sticle picătoare şi „testele rapide" sub formă de hîrtii impregnate, pulberi sau comprimate, livrate în ambalaje cu instrucţiunile de folosire. Deocamdată, se livrează teste rapide pentru albumină, glucoză, acetonă, bilirubină şi pigmenţi sanguini în urină. Ultimul poate fi utilizat şi pentru determinarea hemoragiilor oculte în diverse alte produse patologice. Determinarea pH-ului se face cu hîrtie pH universal ; urobilinogenul cu reactivul benzaldehidic a lui Ehrlich. În plus, se poate decela o infecţie urinară prin testul catalazelor, care nu necesită decît confeti de hîrtie de filtru sau de sugătoare impregnate cu perogen. Se mai poate face o urocultură semicantitativă folosind flaconaşe cu geloză sau „Uricult" incubate la temperatura camerei (vezi subcap. 2. 3).

De asemenea, se poate cerceta streptococul beta-hemolitic din exsudatul faringian, folosind tampoane sterile şi cutii Petri cu geloză-sînge, livrate gata de utilizare, şi care pot fi trimise imediat la laborator, sau puse la termostat sau chiar, la nevoie, lăsate pînă a 2-a zi la temperatura camerei.

O serie de teste rapide (parte în stadiul experimental la noi în ţară), dar care au fost introduse în practică într-o serie de ţări, permit aprecierea orientativă asupra glicemiei, a azotemiei, a unor defecte enzimatice congenitale la nou-născuţi, teste de sarcină, teste serologice pentru diagnosticul prezumtiv de sifilis (VDRL pe lamă), factor reumatoid, mononucleoză infecţioasă, tifos exantematic, bruceloză etc.

Scanned with OKEN Scanner

Toate acestea încap pe un colţ de masă, pe un raft sau pe o tavă sau o trusă, care poate fi transportată la nevoie dintr-un loc într-altul.

Este bine ca în afara testelor rapide, pe tava sau trusa transportabilă să se afle şi unele *materiale şi instrumente* care uşurează sau completează examenul clinic, precum şi *materiale de recoltare* şi, eventual, şi *de însămînţare* a unor produse patologice. Citäm : apăsătoare de limbă, lampă portativă, tampoane montate pentru recoltări din faringe (şi din rect), ansă de platină, pipete Pasteur, tuburi sterile goale, soluţie citrat de sodiu 3,8/100, cutii Petri sterile goale, cutii Petri şi tuburi cu geloză, geloză-sînge (geloză „şocolată" şi Mueller-Hinton), tuburi cu medii lichide (bulion simplu şi glucozat etc.), truse de recoltat şi de însămînţat pentru hemoculturi, uroculturi, lichid cefalorahidian ; seringi şi ace diferite pentru puncţii, lame de sticlă curate şi bine degresate, lampă de spirt, alcool, tinctură de iod etc.

Pentru colectări corecte din colul uterin sau prin puncţii în Douglas, recoltarea nu se face la pat, ci la masa ginecologică, folosind un specul sau valve vaginale.

Eşalonul al II-lea sau *laboratorul minimal* va fi dimensionat şi înzestrat în funcţie de posibilităţile locale. El poate fi improvizat pe o *masă mică* sau extins pe o *masă mare de laborator* şi suplimentat, după posibilităţi, cu 1—2 rafturi, un dulăpior, o chiuvetă, un frigider, un termostat etc. El se va putea, uneori, extinde chiar la o *cameră-laborator*, cu spaţiu suficient nu numai pentru executarea analizelor curente şi pentru pregătirea materialelor, dar şi eventual pentru executarea analizelor folositoare în instituirea, conducerea şi controlul tratamentelor cu antibiotice a cazurilor grave (septicemii, endocardite etc.).

Chiar în forma cea mai rudimentară, punctul de laborator minimal trebuie să cuprindă neapărat cele necesare pentru *executarea cercetărilor microscopice morfotinctoriale curente* (din sînge, urină, produse patologice). Aceste cercetări minimale pot fi realizate în orice unitate sanitară, dacă există bunăvoinţă, perseverenţă şi spirit gospodăresc. Citäm faptul că aceste cercetări foarte simple au putut fi executate chiar şi în condiţii deosebit de vitrege, în condiţii de război, de calamităţi sau în jungla ţărilor calde, graţie perseverenţei şi spiritului inventiv al unor medici, folosind doar lame de sticlă sau cioburi de geam, un microscop de buzunar ţinut în mînă şi o sticlă de colorant. Chiar în aceste condiţii s-au putut recunoaşte şi, ulterior, trata cu succese unele infecţii care puteau fi omorîtoare.

Bineînţeles, în unităţile noastre sanitare există şi se pot crea condiţii mai bune, dar am dat exemplul de mai sus pentru a ilustra faptul că lipsa de condiţii locale nu poate fi invocată ca scuză pentru neexecutarea rapidă şi, la nevoie, a unui minim de investigaţii de laborator.

Un laborator „minimal" de urgenţă, relativ extins, poate avea o înzestrare suficientă pentru a putea face faţă la cercetările hematologice, citologice şi microscopice de microbiologie, parazitologie, micologie curente ; pentru a putea executa un examen sumar de urină, de lichid cefalorahidian, sau al unui produs patologic ; pentru a putea face unele investigaţii sumare orientative de biochimie, folosind teste rapide. În

plus, el poate permite o serie de însămînțări și unele culturi microbiene, precum și cercetări seroimunologice simple de orientare. În sfîrșit, el permite într-o formă ceva mai extinsă, executarea unor analize necesare instituirii și conducerii unui tratament antimicrobian cu antibiotice (antibiograma, determinări de concentrații minime antimicrobiene, determinări de niveluri de antibiotic etc.).

În fig. 6 și 7, se reprezintă schematic și simplificat 4 propuneri de asemenea laboratoare, de la unul foarte simplu *(A)*, la alte 2 intermediare înzestrate mai mult *(B, C)* și la unul mult mai dezvoltat și complex (fig. 7). Dimensionarea, înzestrarea și aranjarea lor poate, bineînțeles, fi schimbată, după posibilități și nevoi. Buna funcționare a acestor laboratoare depinde de perseverența, de spiritul gospodăresc și de interesul depus de medicii care vor lucra acolo. Indiferent de aranjarea aleasă, ea va trebui menținută aceeași, în bună ordine, deoarece trebuie să existe un loc pentru fiecare lucru și fiecare lucru trebuie să stea la locul lui și nu altundeva.

În tabelul IV sînt indicate principalele categorii de aparate, de instrumente și de obiecte, ierarhizate arbitrar în 4 grupe, care pot forma *inventarul de bază* al celor 4 tipuri de laborator propuse mai sus. Se indică, de asemenea, în mod orientativ, domeniile de aplicare a investigațiilor, care pot fi executate în aceste laboratoare. Indicarea detaliată a aparatelor, a dispozitivelor, a ingredientelor, a obiectelor și a reactivilor necesari va fi menționată odată cu descrierea fiecărei tehnici în parte (vezi cap. 3).

Este de recomandat ca, în laborator, să existe cel puțin un rudiment de *bibliotecă tehnică,* pentru a putea fi consultată la nevoie.

Indiferent de dimensiunea ei, *masa de lucru* ar trebui să fie ușor de spălat, ușor de dezinfectat (dacă se infectează întîmplător), să reziste eventual la acizi și la substanțe corosive și la căldură (plasarea pe masă de lucruri fierbinți). Se poate improviza bine o masă de laborator cu plăci de faianță albă (este bine să se intercaleze în aria de lucru, o placă de faianță neagră, care este utilă pentru examinarea macroscopică a unor produse patologice). Întotdeauna, trebuie să existe la îndemînă *apă* (și apă distilată), *soluții dezinfectante,* un vas cu amestec sulfocromic sau alt dezinfectant puternic, *recipiente* (cutii Petri, cristalizoare cu lame curate și altele pentru lame întrebuințate). De asemenea, trebuie să existe la îndemînă o *găleată.* Dacă se lucrează cu materiale septice, pe lîngă vasele cu soluții dezinfectante (eventual cu amestec sulfocromic sau recipiente care merg la sterilizat pentru pipetele infectate), va fi și o găleată separată cu capac acționat cu piciorul și cu găleată interioară sterilizabilă la autoclav.

Înzestrarea trebuie completată, după posibilități și nevoi, cu *sticlărie* : sticle pentru coloranți și reactivi, eprubete (mari, mici și de centrifugă), pipete Pasteur și pipete gradate, cilindri de 100 și 1 000 ml, lame, lamele, sticle de ceasornic de 8—10 cm ∅. *Alte materiale* necesare : pirostrie, creion obișnuit, caiet, hîrtie de filtru, buletine de analiză, creion de scris pe sticlă, leucoplast, foarfecă, pense de disecție, de iris și de forcipresură și altele.

Scanned with OKEN Scanner

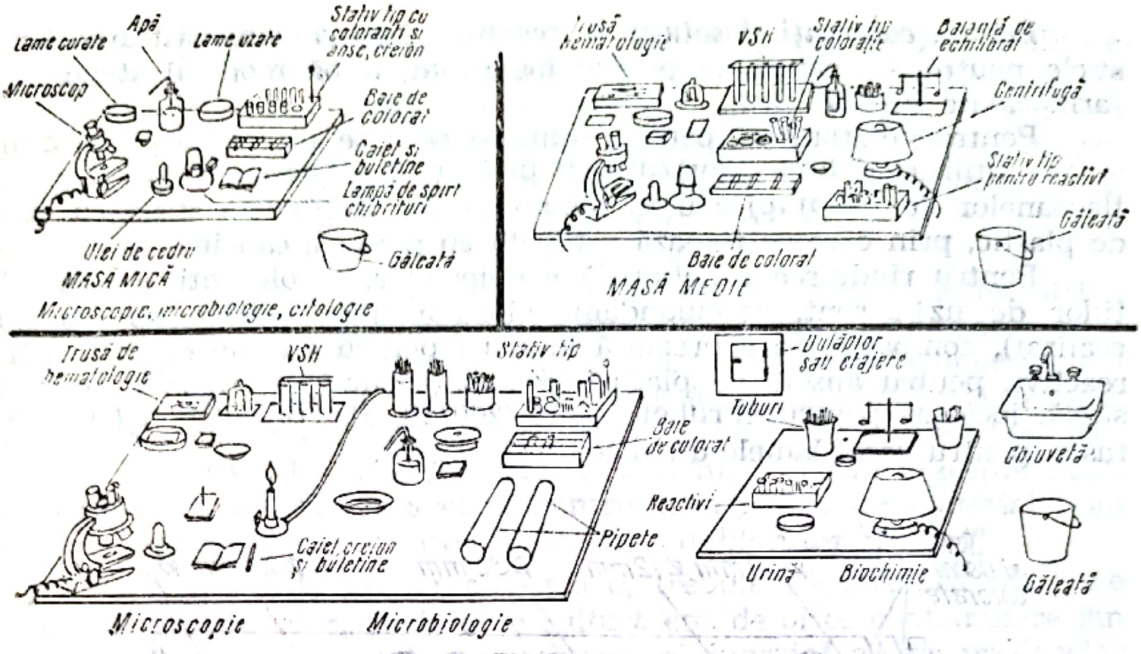


Fig. 6. — *Masă de laborator* (propuneri). Dimensionare și înzestrare diferențiată, în funcție de posibilități și profil de lucru.

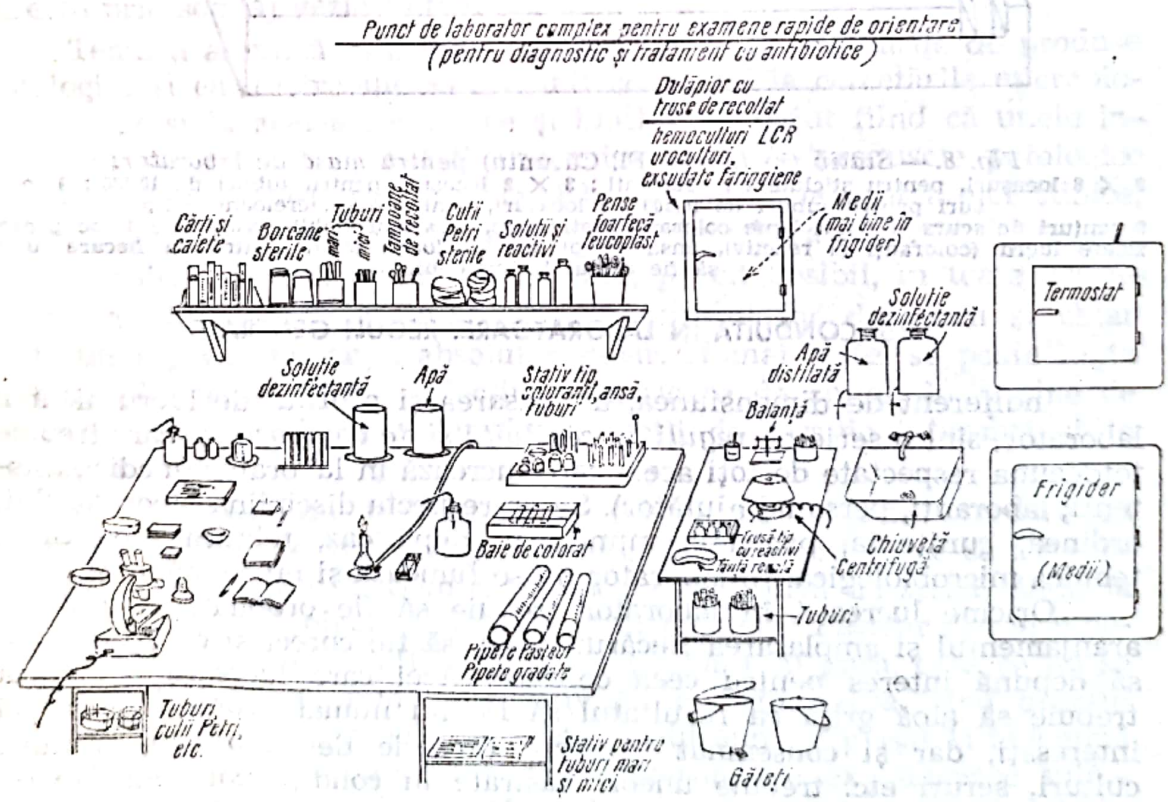


Fig. 7. — *Punct de laborator complex pentru examene rapide de orientare* (pentru diagnostic și tratament cu antibiotice).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru *coloranți* și *soluții de reactivi*, recomandăm păstrarea lor în sticle neutre, cu capac de plastic înșurubat, după modelul sticlelor de farmacie de 20—30 ml.

Pentru coloranți și pentru soluțiile care se utilizează cu picătura, se vor utiliza sticluțe prevăzute cu picător și capac de plastic (de tipul flacoanelor de *Rinofug*) sau mai bine se vor improviza sticle cu capac de plastic, prin care se fixează o pipetă cu pară de cauciuc.

Pentru rînduirea funcțională a obiectelor, a coloranților și a soluțiilor de uz curent, recomandăm folosirea unor *stative tip* (ușor de realizat), compacte, care prezintă locașuri pentru sticlele de coloranți și reactivi, pentru ansele de platină, creion obișnuit și creion de scris pe sticlă, locașuri pentru eprubete mari (200/20, 180/18) și mici (100/10) și rastel pentru uscat lamele după colorare (fig. 8).

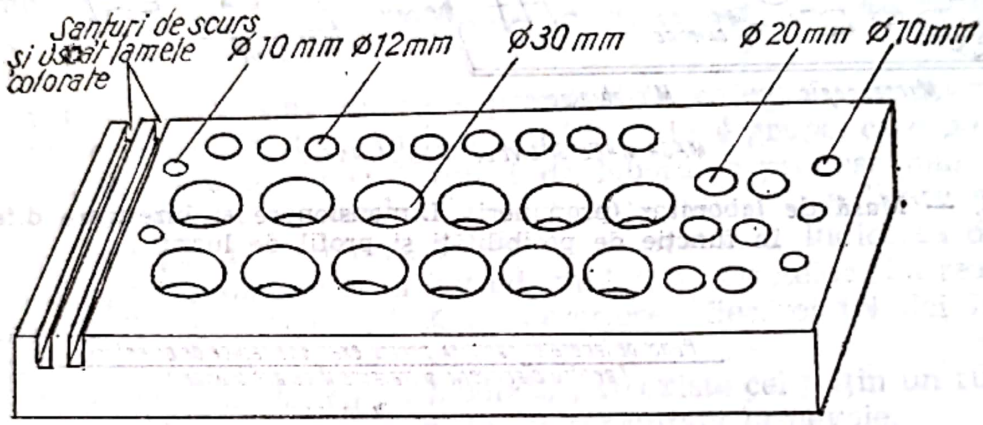


Fig. 8. — *Stativ tip* (model Fl. Căruntu) *pentru masă de laborator:* 2 × 6 locașuri, pentru sticluțe cu coloranți ; 3 × 2 locașuri pentru tuburi de 18/180 ; 9 locașuri pentru tuburi de 10/100 ; 5 locașuri, pentru anse, creioane etc ; 2 șanțuri de scurs și uscat lame colorate. Stativ-bloc, masiv și stabil, avînd cîte 1 loc pentru ficare lucru (coloranți și reactivi, ansă de platină, creioane etc.), pentru ca fiecare lucru să fie așezat la locul lui.

1.3.5. CONDUITĂ IN LABORATOARE. REGULI GENERALE

Indiferent de dimensiunea, amplasarea și profilul de lucru al unui laborator, sînt o serie de *reguli de conduită și de comportare*, care trebuie totdeauna respectate de toți aceia care lucrează în laborator (medici, asistenți, laboranți, personaj ajutător). Se va respecta disciplina laboratorului, ordinea, curățenia, protecția muncii și, după caz, tehnica aseptică și tehnica microbiologică. În laborator nu se fumează și nu se mănîncă.

Oricine lucrează în laborator trebuie să fie ordonat, să păstreze aranjamentul și amplasarea fiecărui lucru, să fie corect și conștiincios și să depună interes pentru ceea ce face. Acei care lucrează o analiză trebuie să aibă grijă ca rezultatul să fie nu numai comunicat la cei interesați, dar și consemnat în scris. O serie de preparate, frotiuri, culturi, seruri etc. trebuie uneori păstrate în condiții corespunzătoare, pentru a fi eventual reexaminate și confruntate cu alte rezultate.

Toate aparatele, instrumentele, obiectele diverse de utilitate în laborator vor fi plasate *ordonat* și totdeauna *gata de utilizare*.

Scanned with OKEN Scanner

Toate aparatele, instrumentele și obiectele care au fost utilizate (eventual murdărite sau contaminate) trebuie imediat tratate, curățate (eventual sterilizate) și pregătite în vederea reutilizării lor. Materialele și obiectele septice vor fi, după caz, fie flambate, fie cufundate în soluții dezinfectante sau oxidante (amestec sulfocromic), fie plasate în conținătoare cu capac, care vor fi trimise la sterilizare, respectîndu-se cu strictețe un circuit bine stabilit și tehnica aseptică.

Tehnica aseptică constă, pe de o parte, din protecția împotriva oricărei contaminări a medicului și a personalului sanitar de toate categoriile din spital și din laborator prin respectarea corectă a unor tehnici de recoltare, transport și prelucrare, prin folosirea eventuală a unor obiecte sau dispozitive de protecție (mască, mănuși, pense, recoltare etc., uneori prin lucru sub ecran protector sau în nișă). Tehnica aseptică mai este desemnată uneori (în special pentru transportul de materiale sau substanțe septice) sub denumirea de „tehnica dublei împachetări".

Tehnica aseptică, pe de altă parte, trebuie să ferească obiectele medicale și de laborator, mediile de cultură etc. de orice contaminare din afară. Ea trebuie să ferească contaminarea și suprainfectarea produselor patologice, din cauza unor manipulări incorecte, ceea ce ar putea duce la alterarea produselor și la greșeli de interpretare a rezultatelor de analiză. Ea trebuie să ferească bolnavii de infecții din afară și în special de infecții iatrogene (exemplu, transmiterea hepatitelor virale, infecții prin sondaj vezical etc.).

Tehnica aseptică este indispensabilă în toate recoltările de produse patologice și ea nu trebuie să se limiteze numai la cercetările microbiologice, dar și la acelea serologice și biochimice, știut fiind că unele infecții, în special virale, pot fi transmise de toate produsele patologice (hepatita virală B este mai frecventă la personalul laboratoarelor clinice, decît la acei care lucrează în alte tipuri de laboratoare).

Tehnica aseptică trebuie respectată, pe cît posibil, în toate activitățile unităților sanitare, indiferent de profilul lor de lucru și chiar acolo unde poate nu ar fi absolut necesar. Numai astfel se poate lupta în mod eficace împotriva infecțiilor interioare de spital, în secțiile de pediatrie, de specialități chirurgicale, secții de terapie intensivă și în alte secții.

În laborator, nu trebuie lăsate descoperite obiecte murdare cu materiale septice. Se vor păstra mîinile curate, dar este bine să fie considerate murdare. Se va flamba totdeauna mușțiucul de sticlă atașat la tubul de cauciuc al pipetelor Potain, gîtul pipetelor Pasteur sau al pipetelor gradate înainte de utilizare (dacă se aspiră cu gura, ceea ce nu se recomandă) și nu se pune alternativ pe ele cînd gura, cînd degetul murdar. În laborator, trebuie să existe întotdeauna și plasat la îndemînă cel puțin un vas cu un dezinfectant puternic (de ex., amestec sulfocromic), un vas cu dezinfectant și unul cu un antiseptic (vezi tabelul V). De asemenea, trebuie să existe săpun, detergenți și perii de unghii și de frecat sticlăria etc.

Scanned with OKEN Scanner

Activitatea de bază în laborator. Activitatea de bază, zilnică, cuprinde : menținerea curățeniei și a ordinei în laborator, pregătirea și întreținerea materialelor ; controlul și protecția aparaturii (microscop, centrifugă, frigidere, termostat etc.) ; protecția muncii, prevenirea incendiilor, a electrocutărilor, a intoxicațiilor, a infecțiilor și supravegherea defectelor de instalație electrică, de gaz și apă, buna funcționare a robinetelor, a canalizării, a ventilației etc.

Curățenia. În afara curățeniei generale, în sensul înțeles de fiecare gospodină, se va da o deosebită atenție menținerii curate a suprafețelor de lucru de pe masa de laborator și a podelei de ciment, mozaic (dar nu linoleum), care vor fi bine curățate, spălate și (eventual) dezinfectate.

Curățenia sticlăriei (pipete, lame, eprubete, tuburi de centrifugă, baloane, cutii Petri etc.) este asigurată printr-o curățenie mecanică, precedată — la nevoie și după caz — de o dezinfecție sau sterilizare prealabilă. Curățirea, la nevoie, cuprinde degresare și curățire mecanică și tratare cu detergenți ; apoi o clătire minuțioasă, pentru îndepărtarea oricărui rest de detergent, de antiseptic sau de substanță antimicrobiană. În continuare, se face pregătirea materialelor (dopuri de vată la pipete, dopuri sau capace la eprubete, la tuburi de centrifugă, la baloane etc.), apoi ambalarea lor corectă și sterilizarea diferențiată, în funcție de material, și conservarea, în condiții care să asigure menținerea sterilității și nealterarea substanțelor și a mediilor de cultură, conținute în unele recipiente.

Toate acestea se desfășoară pe un circuit bine stabilit și cad, de regulă, în sarcina unui sector special al laboratorului central.

În laboratorul minimal, care este întreținut de laboratorul central, nu se execută, de obicei, decît curățirea lamelor de sticlă pentru examene microscopice.

Lamele de sticlă și lamelele noi, se lasă într-o soluție de detergenți 1—2 zile, apoi se pun într-un borcan, care va fi legat la gură cu tifon, și se lasă 1—2 ore sub jet de apă rece de robinet. Ele vor fi apoi clătite cu apă distilată, uscate și păstrate în vederea utilizării. Lamele utilizate cu frotiuri colorate se introduc în amestec sulfocromic pînă a doua zi, apoi se spală bine și se reutilizează. Lamele pe care s-au găsit bacili Koch nu se mai utilizează pentru cercetarea micobacteriilor. Lamele cu produse umede se lasă cîteva ore într-o soluție dezinfectantă (Bromocet, Tego, amestec sulfocromic), apoi se spală și se reutilizează. Lamelele utilizate se aruncă într-o soluție dezinfectantă și nu se mai reutilizează.

Se mai recomandă ca lamele de sticlă să fie fierte 2—3 ore într-un vas smălțuit, cu un amestec care se face cu precauție, adăugînd *încetul cu încetul* un volum de acid sulfuric comercial (sau pur), peste două volume dintr-o soluție apoasă 10/100 de bicarbonat de potasiu *(nu invers,* deoarece se produce o explozie !). Lamele se spală apoi bine cu apă de robinet și se păstrează într-un vas de sticlă cu dop de sticlă (cristalizor cu capac). Pentru cercetări citologice și de morfologie sanguină, se recomandă păstrarea lamelor în alcool cu 5/100 acid clorhidric. Înainte de

Scanned with OKEN Scanner

utilizare, lamele se spală bine cu apă distilată şi se şterg cu un tifon curat. Lamele vor fi ţinute în mînă, totdeauna de margini, fără să se pună degetele pe feţele lamelor. Lamele utilizate care au pe ele balsam de Canada, se lasă 24 de ore în benzină, iar uleiul de cedru se îndepărtează cu xilol, apoi se procedează ca mai sus. Pentru preparatele microbiologice curente, ne vom mulţumi cu introducerea cîteva ore a lamelor în amestecul sulfocromic de mai sus, apoi se spală cu apă şi săpun, se clătesc cu apă, se şterg bine şi se păstrează pe masă într-o cutie Petri sau într-un cristalizor. Dacă se cercetează într-un produs (spută, L.C.R., lichid pleural, puroi etc.) prezenţa de bacili Koch, se folosesc de preferinţă *lame noi* sau deosebit de bine şi îndelung spălate cu apă distilată, fiartă *(nu cu apă de la robinetul de apă caldă!)*. Înainte de utilizare, lamele pot fi flambate la flacără.

Este o gravă greşeală de a considera orice lucru steril ca fiind *ipso facto* şi curat! O serie de germeni grampozitivi şi gramnegativi şi, în special, bacilii acidoalcoolorezistenţi (bacili Koch sau alte micobacterii nepatogene, care se pot găsi pe robinetul de apă caldă) pot adera la sticlă (lame şi tuburi de centrifugă) şi, deşi omorîţi prin sterilizare, ei rămîn vizibili la examenul microscopic, constituind deseori surse de eroare în interpretarea rezultatelor.

O serie de substanţe antimicrobiene, detergenţi, antiseptice, antibiotice oligozaharide sau aminoglicozide, rezistă la sterilizarea prin căldură şi prezenţa lor pe sticlărie poate falsifica rezultatele bacteriologice culturale.

Dezinfectare-decontaminare. Antisepsie. Obiectele şi produsele infectate, care nu pot fi supuse direct unei sterilizări prin autoclavare sau prin căldura uscată, vor fi în prealabil dezinfectate, folosind diverse substanţe a căror acţiune poate fi grupată în mai multe feluri (tabelul V).

Deseori, dezinfectarea trebuie precedată de o curăţire mecanică, pentru îndepărtarea unor substanţe organice în exces. Astfel, pipetele cu sînge, sînt mai întîi ţinute în apă şi apoi bine curăţate. Dacă pe masă, pe podea, pe diverse obiecte sau pe mîini se varsă sau se stropeşte din greşeală un produs septic, trebuie neîntîrziat procedat la decontaminarea acestora, pentru a evita o infecţie de laborator. Se foloseşte, după caz (natura produsului infectant şi natura obiectului de decontaminat), fie un dezinfectant pentru obiecte, fie un antiseptic pentru piele (vezi tabelul V). Obiectele, masa de lucru sau podeaua în zona contaminată, se acoperă cu o hîrtie de filtru îmbibată în dezinfectant şi, după un timp de contact, hîrtia este îndepărtată cu o pensă şi pusă în găleata cu infecte.

Acţiunea de decontaminare se produce după un contact de 10—20 minute, dacă numărul de germeni este mic şi numai cu forme vegetative, sau în 1—2 ore şi chiar în 8—12 ore, dacă materialul contaminat este bogat în spori. După decontaminare, se procedează la o spălare minuţioasă mecanică şi la clătiri repetate cu apă de robinet (la nevoie şi cu apă distilată).

În fiecare laborator, trebuie să fie la îndemînă 1—2 tipuri de dezinfectante şi 1—2 tipuri de antiseptice, şi bineînţeles apă şi săpun.

Tabelul V

Dezinfectante şi antiseptice uzuale (tabel rezumativ)

Substanţe	*Dezinfectante pe obiecte*					*Antiseptice de utilizat eventual pe tegumente şi mucoase*
	Bacterii			Fungi	Virusuri	
	Vegetative	T.B.C.	Spori			
Glutaraldehidă 2% în alcool 70%	+	+	+	+	+	*NU!* Toxic!
Formaldehidă 8% în alcool 70%	+	+	+	+	+	*NU!* Toxic!
Amestec sulfocromic	+	+	+	+	+	*NU!* Foarte coroziv!
Formaldehidă 3–8% în apă	+	+	–	+	+	*NU!* Toxic!
Fenol 1–3% (Lysol 3%)	+	+	–	+	+	*NU!* Iritant, inactivat de substanţe organice
Alcool etilic 70%	+	+	–	+	–	Da. Activitate medie
Tinctură de iod	+	+	–	+	–(+)	Da, dar iritant, păteză
Lugol concentrat (1. 2. 100)	+	+	–	+	–(+)	Da, eventual iritant
Iodofori	+	+	–	+	–(+)	Da, eventual iritant
Hexaclorofen *	+	±	–	+	–	Da. Acţiune medie pe tegumente şi mucoase
Clorhexidina **	+	–	–	+	–	Da. Acţiune medie.
Compuşi cuaternari de amoniu (Bromocet)	+	–	–	+		Da. Acţiune medie-slabă. Curăţă
Compuşi mercuriali	+	–	–	+	–	Da. Activitate slabă
Compuşi cloraţi (Cloramin 5%)	+	–	–	+	–	Activitate slabă. Uneori iritant Inactivat de substanţe organice
Compuşi Tego	+	±	–	+	–	Da (atenţie la diluţiile prescrise)

* În special pe stafilococi
** În special pe gramnegativi
Antiseptice depăşite: acid boric, albastru de metilen, violet de genţiana, (permanganat de potasiu), (apă oxigenată).

Scanned with OKEN Scanner

Sterilizare. În unităţile sanitare, în spitale, în laboratoarele C.S.A. şi în laboratoarele clinice, sterilizarea se face în secţii speciale, folosind autoclave (căldură umedă) sau cuptoare de căldură uscată (uneori în instalaţii speciale cu etilen-oxid), care trebuie manipulate de un personal special instruit şi bine supravegheat. În laboratorul minimal, nu se recurge decît la sterilizarea prin ardere în flacăra becului Bunsen sau a lămpii de alcool (vezi manipularea anselor, a pipetelor, a eprubetelor etc.). Uneori, se poate recurge, pentru distrugerea formelor vegetative (cu excepţia micobacteriilor), fie la fierbere, fie mai puţin bine la flambare, fie excepţional şi încă mai nesigur la iradiere cu raze ultraviolete.

Razele ultraviolete nu asigură decît o sterilizare a aerului din zona iradiată pe o distanţă de aprox. 1 metru şi a suprafeţelor plane, lucioase şi curate aflate în imediata şi directa bătaie a razelor.

Prepararea, aranjarea şi folosirea materialelor de uz curent. O serie de obiecte de uz curent (eprubete, cutii Petri, tuburi de centrifugă, vase diverse, tampoane montate pentru recoltări de produse patologice, seringi sterile cu ace de diferite dimensiuni, pipete Pasteur, pipete gradate), precum şi recoltoarele şi mediile de cultură, eventual aranjate în seturi complexe pentru diferite tipuri de recoltări (hemoculturi, uroculturi, culturi de L.C.R. etc.) şi altele trebuie *preparate, ambalate, sterilizate* şi *păstrate* în laborator, ferite de orice fel de contaminare sau alterare, pînă în momentul utilizării, de preferinţă în cutii metalice sau la nevoie învelite în foi de aluminiu sau de hîrtie şi sterilizate la căldură uscată.

Redăm în fig. 9 cîteva exemple, cu unele sugestii, pentru o mai bună folosire a obiectelor de uz curent.

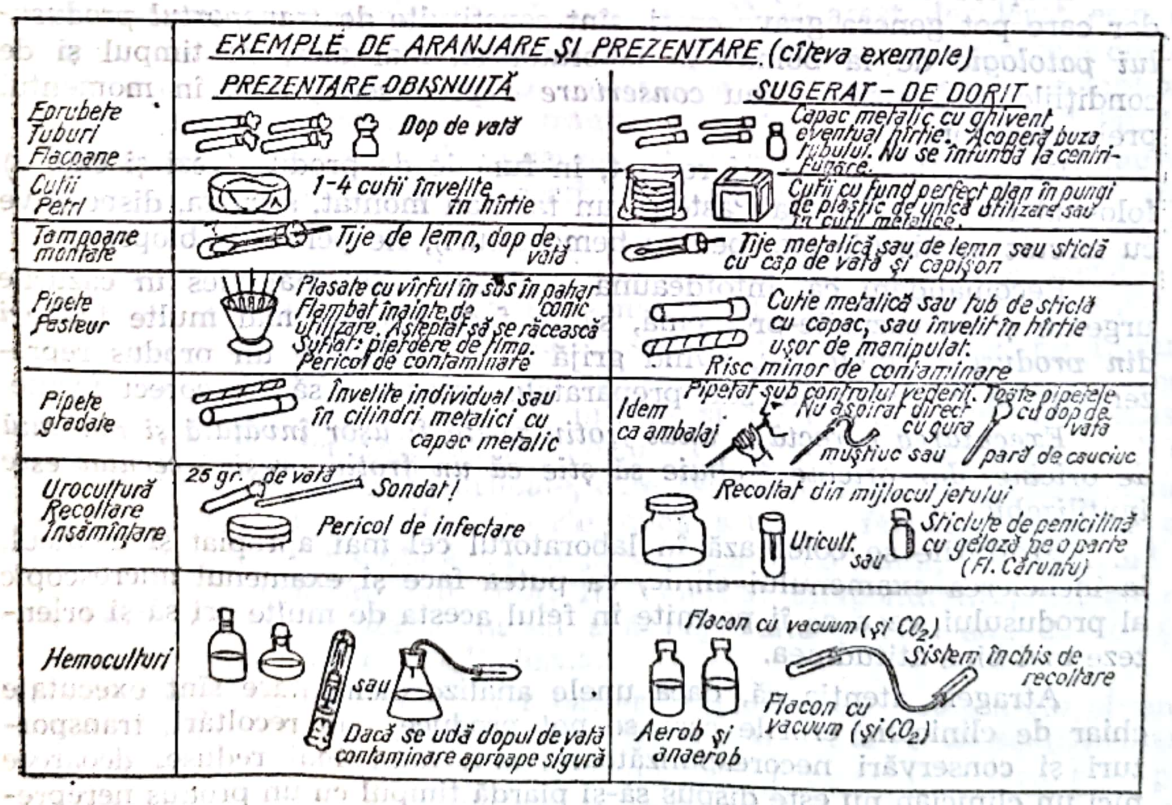


Fig. 9. — Masă de laborator. Exemple de aranjare şi prezentare.

Ordinea, curățenia meticuloasă și respectarea tehnicii aseptice trebuie să fie o preocupare permanentă în laborator.

Se vor verifica, înlocui sau împrospăta materialele, substanțele, mediile de cultură, coloranții și reactivii care se pot altera. Recipientele cu substanțe volatile vor fi bine închise. Sticlele cu coloranți de uz curent vor fi totdeauna bine închise între utilizări. Fiecare recipient trebuie etichetat, cu data preparării conținutului. Dacă se păstrează seruri înghețate, ele vor fi dezghețate numai imediat înainte de a fi folosite. Un ser dezghețat trebuie utilizat imediat sau păstrat doar cîteva zile la +4°C, dar nu reînghețat.

Substanțele toxice și substanțele inflamabile se păstrează conform normelor de siguranță și de protecția muncii.

1.3.6. RECOLTAREA, TRANSPORTUL ȘI CONSERVAREA MATERIALELOR PATOLOGICE

Toate acestea au mai fost discutate în capitolul anterior și se va mai reveni asupra lor în cap. 2, deoarece recoltările se fac diferențiat, în funcție de produs și de manifestările prezentate de bolnav (sînge, urină, L.C.R., exsudat faringian, lichid de puncții, puroi etc.).

Din tot lanțul operațiunilor, care se succed de la indicarea unei analize și pînă la primirea rezultatului, prima etapă, și anume *recoltarea corectă*, constituie condiția *sine qua non* a unui rezultat folositor.

Etapele ulterioare, care sînt deseori minimalizate și necontrolate, dar care pot genera grave erori, sînt constituite de *transportul produsului patologic* de la bolnav la laborator și, mai ales, de timpul și de condițiile de așteptare sau *conservare a produselor*, pînă în momentul prelucrării lor.

Recoltările se fac diferențiat, în funcție de produs (vezi și cap. 2), folosind fie ansa, pipeta Pasteur, un tampon montat, seringa, dispozitive cu circuit închis (de ex., pentru hemoculturi), fie pense de biopsie.

Recomandăm ca, întotdeauna cînd se poate, mai ales în cazurile urgente și în cazurile-problemă, să se facă imediat mai multe *frotiuri din produsele patologice*, avînd grijă să se recolteze un produs reprezentativ și ca frotiurile sau preparatele proaspete să fie corect făcute.

Executarea corectă a unui frotiu poate fi ușor învățată și realizată de oricine, dar oricine trebuie să știe că un frotiu greșit executat este inutilizabil.

Frotiurile se colorează în laboratorul cel mai apropiat și medicul, la încheierea examenului clinic, va putea face și examenul microscopic al produsului, ceea ce îi permite în felul acesta de multe ori să-și orienteze mai bine atitudinea.

Atragem atenția că, dacă unele analize elementare sînt executate chiar de clinician, erorile care se pot produce prin recoltări, transporturi și conservări necorespunzătoare, sînt mult mai reduse, deoarece nici un clinician nu este dispus să-și piardă timpul cu un produs nereprezentativ, supracontaminat sau alterat.

Scanned with OKEN Scanner

Culturi microbiene și analize microbiologice de specialitate. De multe ori, este necesar ca din produsul recoltat să se facă *însămînțări pe medii de cultură (aerobe și eventual anaerobe), tot la patul bolnavului* (hemocultură, culturi din L.C.R., din produse de puncție etc.). Însămînțările se fac pe mai multe medii, din care nu trebuie să lipsească geloza simplă, geloza-sînge, bulionul simplu și glucozat (în funcție de produs se recurge și la alte medii speciale, utilizate de rutină sau la indicația laboratorului de profil).

Transportul produselor patologice. Produsul patologic, după caz, este însămînțat într-un mediu lichid sau este dispersat pe mediu solid, pentru a obține colonii separate, condiție esențială pentru a se face identificări ulterioare.

De cele mai multe ori, produsul patologic într-un conținător corespunzător și steril, însoțit de un buletin de cerere de analiză, este trimis urgent la laborator. Trebuie întotdeauna ca produsul trimis să fie reprezentativ, să nu fie supracontaminat, deteriorat sau denaturat pe parcurs. Acest lucru este deosebit de important pentru aprecierea aspectului și a raportului cito-bacteriologic, al aspectului microbiologic cantitativ și a raportului dintre diferiții germeni (de notat că, deseori, germenii patogeni sînt mai repede distruși sau înlocuiți cu germeni saprofiți, mai puțin pretențioși și cu o multiplicare mai rapidă).

În general, pentru orice tip de produs patologic și pentru orice tip de analize, se recomandă ca transportul la laborator și apoi analiza respectivă să se facă în cel mai scurt timp după recoltare. Prelucrarea imediată asigură rezultatul cel mai bun. Dacă acest deziderat este de obicei posibil, pentru analizele curente executate în laboratoarele clinice de secție, el este încă greu de realizat pentru analizele mai complexe, pentru care produsele trebuie transportate la distanțe mai mari pînă la laboratorul central, la laboratoarele C.S.A. sau la cele de profil sau de referință, unde analiza respectivă se execută după un timp mai îndelungat.

Produsele pentru investigații microbiologice sînt transportate și, eventual, conservate cu cea mai mare grijă. Dopurile de vată de la eprubetele sau baloanele cu medii sau cu produse lichide, nu trebuie să se ude, deoarece aceasta mijlocește infecții : suprainfectarea a ceea ce este în conținător, putînd infecta și pe cei din jur (din această cauză, există tendința de a înlocui dopurile de vată cu dopuri de cauciuc sau cu capace înșurubate, care asigură o bună etanșeitate). Dacă produsul este în cantitate foarte mică sau s-a făcut o recoltare cu tamponul, trebuie evitată cu grijă uscarea produsului, fie realizînd o atmosferă umedă în conținător, fie umezind tamponul în prealabil cu soluție Ringer lactozată sau cu apă peptonată sterilă, sau cu soluție tampon fosfați (pH 7,2—7,4) sterilă.

Unii germeni, în special bacteriile patogene, protozoarele și unii paraziți pluricelulari, sînt distruși sau nu mai pot fi recunoscuți, în mare parte (sau total), după ieșirea lor din organism, prin bacterii multiple coexistente în unele produse, prin modificări de temperatură, de pH, de lumină, prin deshidratare, prin oxigenul din aer, prin autoliză, prin

Scanned with OKEN Scanner

concurență microbiană în produsele plurimicrobiene sau supracontaminate, prin detergenți, dezinfectante, antibiotice, sau inhibitori aflați în recipient sau pe instrumentele de recoltare etc.

Însămînțarea produselor direct pe medii adecvate de cultură la patul bolnavului, urmate de incubare la 35°, transportul imediat la laborator sau păstrarea pînă a doua zi într-un termostat, este metoda cea mai bună pentru : hemocultură, culturi de L.C.R., culturi pentru evidențierea anaerobilor, coproculturi pentru izolarea shigelelor, culturi pentru izolarea unor germeni (streptococi beta-hemolitici, meningococi, gonococi, Bordetella pertussis, Hemohpilus influenzae, fungi și alți germeni sensibili). În lipsa accesului la un termostat, mediul însămînțat (dacă este pus într-un conținător destul de rigid și ermetic închis) poate fi menținut și transportat la temperatura corpului. Transportul produselor la temperatura ambiantă *pe medii de conservare,* care stînjenesc multiplicarea bacteriilor, este aplicat în cazurile în care nu este posibilă însămînțarea la patul bolnavului, mai ales pentru produsele care conțin (și în care se pot multiplica) microorganisme din flora normală și pentru acelea cu număr mic de germeni patogeni. Pentru izolarea bacteriilor, se poate folosi mediul de conservare Stuart sau, în lipsă, bulion nutritiv sau anaerob, preferabil cu adaos 0,5% agar.

Pentru izolarea bacteriilor *anaerobe,* trebuie luate măsuri speciale de precauție, deoarece contactul cu aerul atmosferic poate fi bactericid în cîteva minute pentru unii din acești germeni. Produsele sînt introduse în flacoane închise ermetic, care conțin azot, bioxid de carbon sau alt gaz lipsit de oxigen, preferabil și cu cîteva picături dintr-un indicator redox (de ex., rezazurină 0,003/100) și, eventual, și un agent reducător (de ex., cisteină hidroclorică). Produsul mai poate fi transportat în seringă, golind aerul din ea și astupînd seringa cu un ac al cărui vîrf este înfipt într-un dop de cauciuc. Într-un produs purulent, anaerobii supraviețuiesc mai mult. Tampoanele sînt cufundate într-un mediu pentru anaerobi. Fragmentele de țesut pot fi transportate cu mai puține precauții, deoarece în aceste țesuturi anaerobii pot supraviețui mai mult, totuși este bine să fie puse în conținătoare etanșe, fără aer.

Pentru izolarea micoplasmelor, tampoanele faringiene sînt cufundate în bulion nutritiv cu adaos 0,5% de albumină bovină.

Pentru izolarea virusurilor (din căile respiratorii, gură, rect, piele, ochi etc.), produsele se transportă pe bulion sau mediu Hanks, ambele preferabil cu adaos de albumină bovină sau gelatină 0,5—1%.

Pentru izolarea citomegalovirusurilor, transportul se face pe sorbitol 70%.

Pentru izolarea virușurilor din urină, produsul este transportat pe o soluție care conține penicilină 500 U./ml, streptomicină 500 mcg/ml, nistatină 200 U/ml.

Serul fiziologic netamponat și fără adaos de albumină bovină sau gelatină nu este indicat ca mediu de transport, el fiind deseori bactericid și virusulicid.

Transportul produsului patologic nativ și conservarea pe timp de 1—2 ore la temperatura ambiantă trebuie evitată pe cît posibil, mai ales vara. Totuși, se poate folosi (cu rezultate mai inferioare) pentru

materii fecale, pentru izolarea celor mai multe bacterii și virusuri enterale, pentru puroi, pentru izolarea bacililor aerobi și pentru tampoanele faringiene pentru izolarea streptococilor beta-hemolitici.

Urina pentru urocultură poate fi conservată ca atare maximum 1 oră. *Materiile fecale*, pentru cercetarea ouălor și larvelor de helminți, precum și pentru chisturi de Giardia pot fi conservate în aceste condiții mai mult timp.

Transportul la cald (recipientul cu mediul însămînțat sau cu produsul ca atare este cufundat într-un vas cu apă la 37° sau la nevoie transportat în vas rigid și ermetic închis, ținut la temperatura corpului) se face cît de repede. El permite izolarea unor agenți sensibili la rece (meningococi, gonococi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis), precum și pentru evidențierea protozoarelor sub formă de trofozoizi mobili (Giardia, Trichomonas, amibe etc.).

Conservarea la rece (+4°C) la gheață și plasarea în frigider este indicată în cazurile în care prelucrările microbiologice nu se fac decît după cîteva ore. La această temperatură, cele mai multe bacterii supraviețuiesc un timp variat de îndelungat, fără a se multiplica deloc sau foarte lent. Metoda este indicată, mai ales, pentru produsele plurimicrobiene, deoarece împiedică în mare parte concurența microbiană, păstrînd astfel nemodificată proporția dintre diferitele specii și tipuri de germeni. Urina se poate păstra în aceste condiții 12—24 de ore. Pentru izolarea virusurilor, conservarea acestora este mulțumitoare doar timp de 2—3 ore. Produsele trebuie să fie în cantitate mică (maximum cîteva zeci de ml), pentru ca refrigerarea să se poată face cît mai repede după recoltare.

Conservare la temperaturi foarte joase. Majoritatea virusurilor se inactivează la temperatura ambiantă. Durata de supraviețuire este cu atît mai lungă cu cît temperatura este mai joasă. Pentru un transport de maximum 2 zile, se poate folosi un amestec de gheață și sare sau plasarea în congelatorul unui frigider (între —8° și —12°).

Pentru un timp mai îndelungat, trebuie folosite pentru transport termosuri cu gura largă, umplute pînă la jumătate cu amestecuri refrigerente (clorură de calciu cristalizată și gheață, ceea ce realizează —55°). În frigidere speciale și în azot lichid (—70°), virusurile rezistă foarte mult timp.

Produse pentru cercetări microscopice. Lamele cu frotiuri pentru examene *bacterioscopice* se fixează la flacără, imediat după uscare, și se transportă la laborator în cutii sau învelite în hîrtie. Pentru cercetări hematologice și citologice exfoliatrice, lamele imediat după uscare se trimit la laborator nefixate (sau fixate cu alcool metilic). Produsele pentru examene *citologice*, sub formă de frotiuri, se tratează ca pentru cercetări hematologice. Produsele sub formă de frotiuri din fragmente mici, executate la patul bolnavului, se fixează cît mai repede cu alcool metilic 2 minute. Sub formă de produs nativ sau fragmente de biopsie, se transportă cu mare urgență la laborator sau se introduc în fixatoare speciale sau, la nevoie, se conservă la rece, timp scurt în cameră umedă (cutie Petri cu fundul acoperit cu o foaie de hîrtie de filtru muiată în apă sterilă).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru *obținerea și conservarea serurilor*, în vederea examenelor serologice, trebuie ca sîngele să fie recoltat într-o eprubetă perfect curată și sterilizată la autoclav și uscată sau cu pereții interiori ușor umeziți cu ser fiziologic sau cu bulion steril. După coagulare, se detașează binișor cheagul de pereții tubului cu o pipetă Pasteur închisă la vîrf și se așteaptă retracția cheagului, care este favorizată prin plasarea tubului în termostat 1/2—3/4 oră; după separarea serului (eventual după o centrifugare prealabilă), se recoltează serul în mod steril prin decantare sau mai bine cu o pipetă Pasteur. Recoltarea este ușurată dacă se folosește o pipetă Pasteur cu vîrful îndoit în cîrlig (montată pe un tub prelungitor de cauciuc prevăzut cu un mușțiuc flambabil), ceea ce permite aspirarea serului sub controlul vederii, fără a tulbura depozitul de hematii (vezi mai departe fig. 12).

Recoltarea de plasmă (de pe un sînge recoltat pe anticoagulant) este mai rar folosită.

Serul separat de cheag poate fi păstrat la +4°, timp de cîteva săptămîni și la —20° timp îndelungat. Sîngele integral poate fi păstrat 12 (24 !) ore la temperatura ambiantă sau la +4°, dar el nu va fi înghețat, deoarece se produce repede o hemoliză.

Produsele pentru examene biochimice se transportă cît mai curînd la laborator. În funcție de produs și de felul analizei, recoltarea și transportul se fac conform indicațiilor laboratorului de biochimie. Păstrarea serului nehemolizat 24 de ore la +4° nu modifică semnificativ valorile transaminazelor.

Lichidul cefalorahidian trebuie transportat și examinat citologic în decurs de cel mult 1 oră, deoarece celulele aflate acolo se distrug repede. Celulele din lichidul duodenal (bila A) se distrug și ele repede și, din această cauză, examinarea trebuie făcută cît de curînd. Celulele din spută și materii fecale se pot conserva la rece 12—24 de ore. Pentru examene hematologice, se poate folosi sînge recoltat pe un anticoagulant.

1.3.7. MANOPERE ELEMENTARE

Manoperele elementare, minimale și indispensabile, pot fi reduse la 5. Ele se execută, în parte, chiar la nivelul bolnavului, în parte la laborator și constau din : *fixare, colorare, microscopie, centrifugare, tehnica microbiologică* (tehnica aseptică, ordine, manipularea ansei, a pipetelor, diluții etc.).

1.3.7.0.1. Fixarea frotiurilor. Pentru examene bacterioscopice frotiurile, după ce s-au uscat, se fixează prin trecerea de 2—3 ori prin flacără (cu preparatul în sus). Încălzirea trebuie să fie moderată ca intensitate și durată (după trecerea prin flacără, căldura lamei trebuie să poată fi încercată pe dosul mîinii). Căldura unei lămpi cu alcool este sensibil mai puțin caldă decît aceea a unui bec cu aragaz sau cu gaz metan.

Pentru examene citologice, se folosește o fixare de 1—3 minute cu alcool metilic sau cu fixatorul colorant May-Grünwald (vezi *1.3.7.0.2.4.*) Cînd este cald (vara), acoolul metilic se evaporează repede și, din această cauză, trebuie vegheat ca preparatul să nu se usuce în timpul fixării.

Scanned with OKEN Scanner

adăugînd eventual alcool metilic (aceasta este valabil și pentru soluția May-Grünwald, care conține alcool metilic și la care un eventual exces de alcool metilic nu strică).

1.3.7.0.2. Colorarea. Dintre multiplele metode de colorare, cele mai utilizate și indispensabile sînt doar 4, care pot fi folosite într-una din variantele lor (tabelul VI). Vezi și anexa 1 și 2 pentru formula coloranților și a reactivilor.

Observații. Timpul de colorare poate varia, în oarecare măsură, în funcție de calitatea coloranților și a ingredientelor. Din această cauză, cu fiecare lot nou de colorant sau dacă colorantul nu a fost utilizat mult timp și poate s-a alterat, s-a evaporat în parte sau s-au produs precipitări, se va face o colorație de probă cu germeni cunoscuți și cu un frotiu de sînge.

Sticlele cu coloranți și cu reactivi volatili, vor fi bine închise între utilizări. Pentru colorație, lamele se plasează pe stativul băii de colorare. Colorația cu albastru de metilen și cea cu Gram pot fi făcute și ținînd lama între două degete, iar colorația Ziehl — cu lama ținută cu o pensă. Colorația Giemsa se face pe stativul curat și nu în vecinătate de acizi sau de alcalini volatili.

Se va pune pe frotiu, cu grijă, destul colorant, pentru a acoperi în întregime preparatul, dar nu în exces ca să curgă de pe lamă.

1.3.7.0.2.1. Colorația cu albastru de metilen este cea mai simplă și deosebit de utilă. Germenii și celulele apar colorați în albastru de diferite intensități ; unele elemente se pot colora ușor metacromatic cu o nuanță violet-roșiatică. Recomandăm albastru de metilen „boraxat" sau „tamponat" (Field A) (vezi *Anexa 2).* În lipsă, se poate utiliza chiar cerneală albastră de stilou, care este des mai bună decît nimic.

1.3.7.0.2.2. Colorația Gram (vezi și *Anexa 2)* diferențiază germenii grampozitivi (violeți) de cei gramnegativi (roșii). Întrucît violetul poate produce deseori precipitate, se recomandă filtrarea colorantului (se acoperă preparatul de pe lamă cu o bucată de hîrtie de filtru, peste care se toarnă violetul). După colorare, se aruncă hîrtia de filtru și se spală repede preparatul. Se recomandă să se facă o colorație *rapidă,* fiecare timp durînd doar 10—50 secunde și cu *spălare cu apă* între fiecare timp. Diferențierea (decolorarea) cu alcool-acetonă se prelungește 5—10—15 secunde, cît timp mai iese culoarea violet, dar nu prea mult, deoarece unii germeni grampozitivi (de ex., bacilul difteric) își pot pierde „Gramul", în aceste condiții. Se controlează calitatea tehnicii, folosind germeni de referință : unul grampozitiv (de ex., stafilococ) și unul gramnegativ (de ex., colibacil).

Colorația Gram poate fi înșelătoare în unele produse patologice, dacă preparatul este prea gros, dacă colorația de fond este prea intensă (de ex., fucsină insuficient diluată) sau, uneori, dacă unii germeni sînt foarte tineri sau dimpotrivă degenerați. Sub acțiunea unor antibiotice, cu acțiune pe peretele bacterian, unii germeni își pierd cîteodată colorația grampozitivă.

1.3.7.0.2.3. Colorația Ziehl (vezi și *Anexa 2)* diferențiază bacilii acidoalcoolorezistenți (de ex., bacilul Koch), care se colorează în roșu, de ceilalți germeni și de elementele celulare, care se colorează în albastru

Tabelul VI

Cele 4 coloraţii de bază
(bacteriologice, hematologice şi citologice)

Coloraţii bacteriologice (*Fixarea se face la flacără*)	**Albastru**	Albastru de metilen cu borax sau tamponat (Field A) 2—10 sec.	Spălare →	Uscare—Examinare					
	Gram	Violet de metil sau Violet de genţiana sau Cristal violet	Spălare rapidă →	Lugol 10—30 sec.	Spălare →	Alcool—Acetonă (decolorare diferenţiată) 10—15 sec.	Spălare →	Fucsină diluată 1/10—1/20 sau Safranină 5—10 sec.	→ Spălare — Uscare — Examinare
	Ziehl	Fucsină fenicată (la cald, dar nu la fierbere) 5—6 min.	Spălare →	Alcool—Acid (decolorare diferenţiată) 10—30 sec.	Spălare →	Albastru de metilen sau Acid picric 10—15 sec.	→	Spalare — Uscare — Examinare	
Coloraţii hematologice şi citologice *Fixarea* se face cu alcool metilic. Pentru coloraţia Giemsa se fixează cu May-Grünwald (3 min.) apoi se acoperă lama cu acelaşi volum de apă neutră (1 min.), după care se scurge şi se colorează imediat cu Giemsa.	**Giemsa**	Giemsa diluat (1—2 picături la 10 ml apă *neutră*) 15—20 min.	Spălare foarte bine →	Uscare — Examinare					
	Variante	Giemsa „rapid", Giemsa 1 vol., Alcool metilic 2 vol. 1—2 min.	→	Se acoperă cu acelaşi volum de *Apă neutră* 2 min.	→	Se adaugă din nou Apă neutră 1 min.	→	Spălare — Uscare — Examinare	
		Colorant Field A. 1—2 sec.	Spălare rapidă →	Colorant Field B 1—2 sec.	Spălare →	La nevoie, recolorare cu Field A. Frotiul trebuie să fie violet	→	Spălare — Uscare — Examinare	

sau în galben palid (vezi mai jos). Colorarea cu fucsină fenicată trebuie făcută la o temperatură moderată (pînă la emiterea de vapori, dar nu pînă la fierbere), timp destul de prelungit (minimum 4—5 minute), avînd grijă să nu se usuce preparatul, adăugînd la nevoie din nou colorant pe măsură ce se evaporă. Decolorarea se prelungeşte pînă cînd nu mai iese culoarea şi preparatul rămîne practic incolor. Colorarea de fond nu va fi prea intensă, pentru a nu jena contrastul de culoare; se poate folosi o scurtă colorare cu albastru de metilen, eventual diluat, sau cu o soluţie de acid picric, care realizează un contrast mai bun, pe un fond mai luminos şi mai transparent, galben palid, pe care se disting bine bacili acidoalcoolorezistenţi.

1.3.7.0.2.4. Coloraţia Giemsa sau *May-Grünwald-Giemsa* (vezi şi *Anexa 2*) se utilizează pentru sînge, pentru examene citologice şi pentru colorarea unor paraziţi unicelulari (Plasmodium, Trypanosoma etc.).

Trebuie controlată calitatea tinctorială a coloranţilor, care nu trebuie să aibă precipitate pe fund, să nu se fi evaporat o parte din alcoolul metilic din coloranţii de bază. Se foloseşte apă neutră (apă distilată fiartă bine înainte de utilizare, pentru eliminarea CO_2 dizolvată în apă, sau apă neutralizată cu o mică cantitate de carbonat de litiu, sau apă tamponată, sau amestec de apă alcalină de robinet cu apă distilată acidă, în care caz pH-ul amestecului va fi riguros controlat). Pentru controlul neutralităţii apei, se adaugă, la 10 ml apă de cercetat, o picătură dintr-o soluţie alcoolică 1% de hematoxilină. După 1—5 minute, dacă apare o coloraţie galben-roşiatică, apa este acidă; dacă apare o coloraţie brun-albastră, apa este alcalină; dacă apare o coloraţie violet palidă („ametist"), apa este neutră.

Pentru controlul coloraţiei, cînd se începe o sticlă nouă de colorant, se examinează la microscop, cu obiectiv uscat şi apoi cu imersie, un frotiu de sînge colorat. Lama trebuie să prezinte o nuanţă violetă, nici albastră (prea alcalină), nici roşie (prea acidă). Hematiile, nucleii, citoplasma şi granulaţiile din leucocite trebuie să fie corect colorate şi bine diferenţiabile.

Cilindrul (sau eprubeta) în care se face diluţia de Giemsa în apă, trebuie să fie perfect curat (în cilindrii nespălaţi şi lăsaţi pe masă pot creşte diverşi germeni din aer şi care vor apărea în preparat, constituind o sursă de eroare).

1.3.7.0.2.5. Coloraţia Field (vezi şi *Anexa 2*) este rapidă, uşor de executat, şi diferenţiază bine paraziţii din sînge şi din ţesuturi hematopoietice, dar nu pune în evidenţă granulaţiile neutrofile din polinucleare.

1.3.7.0.3. Microscopia. Microscopul este un instrument de precizie. Claritatea imaginilor, funcţionarea părţilor mecanice şi durata de bună funcţionare depinde în mod nemijlocit de modul cum este folosit şi întreţinut. Microscopul trebuie mînuit curat, cu mîini curate şi uscate. Dacă se murdăreşte, mai ales cu ulei de cedru, el va fi imediat şters şi curăţat cu grijă, folosind o cîrpă curată, eventual muiată în xilol.

Scanned with OKEN Scanner

Se utilizează, de preferință, un *microscop binocular,* cu 1—2 perechi de oculare și 3—4 obiective (2—3 uscate și o imersie, de preferință telescopică, care este mai ușor de manipulat). (Centrarea luminii va fi făcută conform Instrucțiunilor din prospectul care, întovărășește microscopul respectiv).

Pentru *examinarea microscopică a unui preparat,* se utilizează de obicei, pe rînd un obiectiv uscat cu mărire mică (de ex., ×20) și condensatorul lăsat în jos; apoi un obiectiv uscat cu mărire mai mare (de ex., × 40) și condensatorul ridicat în sus și, în sfîrșit (dacă este necesar), și imersia. În felul acesta, se poate obține o imagine a întregului preparat, se poate depista răspîndirea, eventual neuniformă, a unor elemente figurate, se pot alege acele cîmpuri vizuale cu elemente deosebite sau mai bine colorate și care merită să fie văzute cu imersia. În toate examenele histologice, citologice, bacteriologice și parazitologice, acest fel de examinare este absolut indispensabil. Pentru punerea la punct, mai ales cu imersia, se folosește cu grijă și băgare de seamă viza macrometrică și doar pentru punerea fină la punct și viza micrometrică, care nu trebuie mînuită, în sus și în jos, decît cu 1—2 învîrtituri.

În general, dacă preparatul a fost pus la punct cu un obiectiv mic, aducerea în axul microscopului a unui alt obiectiv prin rotirea revolverului, va realiza de asemenea o punere la punct aproape bună. Pentru trecerea de la un obiectiv uscat la imersie, este însă necesar să se ridice tubul microscopului cu viza mare, să se plaseze o picătură de ulei de cedru pe preparat și apoi să se coboare din nou tubul, pînă se face contactul dintre obiectivul de imersie și uleiul de cedru. Punerea la punct este oarecum delicată, deoarece nu trebuie să se apese imersia pe preparat, riscînd astfel să se înfunde lentila frontală, ceea ce duce la stricarea imersiei. Dacă imersia este telescopică, acest pericol scade; se coboară imersia pînă în contact cu lama și apoi se ridică încet pînă se pune la punct. În general, pentru cercetări bacteriologice se folosește o lumină puternică cu condensatorul ridicat sus. Coborînd ușor condensatorul, se poate deseori distinge capsula unor bacterii, prin diferența lor de refringență.

Imediat *după utilizare,* se șterge imersia cu degetul curat, cu un tifon curat și uscat, apoi la nevoie cu unul muiat în cloroform (nu în xilol, deoarece acesta poate dizolva balsamul de canada, care solidarizează lentilele imersiei). Se șterge microscopul, se coboară condensatorul, se aduce obiectivul mic în dreptul lui și se acoperă cu grijă.

1.3.7.0.4. Centrifugarea. De preferință, se folosește o *centrifugă unghiulară* de 3 000 ture/minut, cu 6 cupe metalice și tuburi de centrifugă, cu o capacitate de 10 ml și cu fundul rotund.

Tuburile de centrifugă trebuie să fie *perfect curate* și sterile, deoarece dacă conțin germeni gramnegativi sau acidoalcoolorezistenți, chiar morți, ei vor fi regăsiți în frotiul din sediment, inducînd în eroare pe examinatori. Înainte de sterilizare, tuburile se astupă cu un căpăcel confecționat din hîrtie sau staniol (în lipsa unor căpăcele metalice speciale). Dacă se folosesc tuburi cu dopuri de vată, ceea ce nu este

Scanned with OKEN Scanner

indicat, acestea trebuie fixate cu un ac ca să nu fie împinse în fundul tubului în timpul centrifugării (fig. 10).

Se va verifica întotdeauna *fundul cupelor metalice* de centrifugă, pentru a se constata prezența amortizorului de cauciuc, deoarece tuburile de centrifugă nu trebuie să fie în contact direct cu fundul metalic al

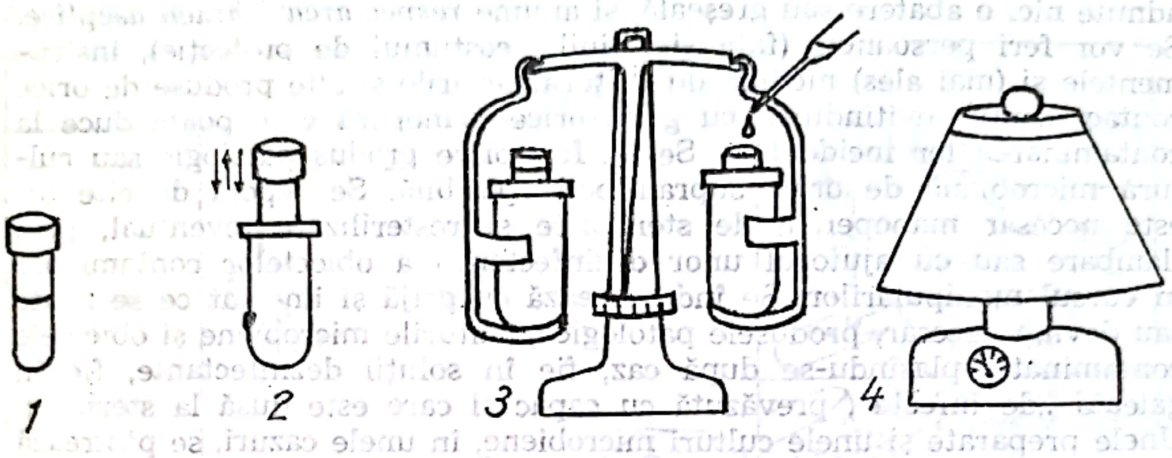


Fig. 10. — Manopere curente de laborator. Centrifugarea.
1 — Tub de centrifugă perfect curat, cu capișon. *2* — Cupă metalică. Se verifică fundul cupei, dacă nu sînt cioburi de sticlă. *3* — Cupele se echilibrează perfect, apoi se așază față în față în centrifugă. *4* — După plasarea cupelor, se pune capacul se pornește centrifuga *încet*. *Centrifuga* se oprește *încet*.

cupelor ; de asemenea se observă dacă în cupă nu au rămas bucăți de sticlă de la tuburi sparte la centrifugare.

Tuburile cu materialul de centrifugat, împreună cu cupele metalice respective, *se echilibrează* cu mare grijă două cîte două (una cu produsul de centrifugat și cealaltă cu apă) și plasate vis-a-vis în centrifugă. Cupele neutilizate, cu sau fără tuburi, se scot din centrifugă.

Centrifuga se închide cu capacul ei, apoi este pornită încetul cu încetul, netrecîndu-se la o viteză superioară, înainte de a se fi stabilizat la viteza inferioară. După centrifugare, se lasă centrifuga să se oprească de la sine.

Dacă, în timpul centrifugării, se sparge un tub în centrifugă, se oprește centrifuga și cupa cu conținutul ei se dă la sterilizat, apoi se curăță bine, se verifică fundul cupei (vezi mai sus) și numai după aceea este repusă în circulație. Echilibrarea incorectă și pornirea prea rapidă a centrifugei sînt cele două cauze majore ale deteriorării rapide a centrifugelor.

În funcție de scopul urmărit, se recoltează și se prelucrează fie *sedimentul* de centrifugare, din care se pot face frotiuri, fie *supranatantul*.

1.3.7.0.5. Elemente de tehnică microbiologică. Tehnicile microbiologice, care trebuie cunoscute și aplicate de specialiști în diverse ocazii, sînt foarte numeroase, unele deosebit de pretențioase și care cer o mare tehnicitate.

Pentru executarea examenelor elementare curente, însă, la nivelul bolnavului sau în imediata sa apropiere, este suficient să se execute corect doar cîteva operații simple, ca : frotiuri și preparate umede pentru

Scanned with OKEN Scanner

examene microscopice, utilizarea corectă a ansei de platină și a pipetelor, însămînțări, dispersii, repicări, transvazări și distribuții de volume fixe. Dacă există un punct de laborator mai complet înzestrat, se vor putea executa și cîteva tehnici mai deosebite (vezi cap. *2.2.5).*

În toate tehnicile microbiologice, există o regulă de fier, care trebuie respectată cu o deosebită conștiinciozitate și față de care nu se admite nici o abatere sau greșeală, și anume *respectarea tehnicii aseptice.* Se vor feri persoanele (fața și mîinile, costumul de protecție), instrumentele și (mai ales) mediile de cultură, serurile și alte produse de orice contact septic, evitîndu-se cu grijă orice manoperă care poate duce la contaminarea lor incidentală. Se va feri orice produs patologic sau cultură microbiană de orice suprainfecție posibilă. Se repetă de cîte ori este necesar manoperele de sterilizare și resterilizare (eventual, prin flambare sau cu ajutorul unor dezinfectanți) a obiectelor contaminate în cursul manipulărilor. Se îndepărtează cu grijă și imediat ce se poate sau devine necesar, produsele patologice, culturile microbiene și obiectele contaminate, plasîndu-se după caz, fie în soluții dezinfectante, fie în găleata „de infecte", prevăzută cu capac și care este dusă la sterilizat. Unele preparate și unele culturi microbiene, în unele cazuri, se păstrează în condiții bune de protecție pentru colecții microbiene sau pentru cercetări ulterioare (vezi cap. *3).*

Manoperele curente și tehnicile microbiologice se învață cel mai bine urmărind cu atenție cum lucrează o persoană experimentată, apoi executînd singur lucrul în mod repetat, sub îndrumarea unei persoane experimentate. Astfel, se învață corectitudinea manoperei, dar tot astfel se pot căpăta și deprinderi proaste, dacă persoana de la care învață, deși lucrează de ani de zile, nu lucrează curat !

Vom da cîteva indicații generale privitoare la unele operații curente.

1.3.7.0.5.1. Masa de laborator, în aria de lucru, trebuie să fie curată și lipsită de orice obiect, care nu este folosit în acel moment. Se va lucra în vecinătatea imediată a unei flăcări (bec de gaz), pentru a putea face în mod repetat flambările necesare. Pe masă, cel ce lucrează va avea la îndemînă : ansa de platină, pipete sterile, lame și lamele, apă distilată și ser fiziologic steril (eventual medii de cultură), cilindri cu dezinfectante (de ex., cu amestec sulfocromic) și o găleată de „infecte". În timpul lucrului cu medii de cultură, nu trebuie să se producă curenți de aer, și, de asemenea, nimeni nu trebuie să vorbească, să tușească, sau să strănute. Trebuie evitate mișcările bruște și intempestive, atunci cînd se lucrează cu materiale septice, pentru a nu se produce picături sau aerosoli periculoși.

1.3.7.0.5.2. Ansa de platină folosește la prelevat produse patologice, la făcut frotiuri, la însămînțări pe medii de cultură, la dispersări pe medii de cultură solide, la izolări și repicări de colonii microbiene, precum și la prelevări semicantitative (cu anse calibrate), în vederea obținerii unor diluții aproximativ cunoscute.

Ansa „de platină" se compune dintr-un fir metalic (de platină sau de nichelină) de aprox. 1/2—1 mm grosime și de aprox. 4—5 cm lungime, avînd la capăt o buclă închisă de aprox. 3 mm ∅ ; la celălalt capăt, este

fixat de un „port ansă", compusă dintr-o tijă metalică ușoară, flambabilă, de aprox. 20 cm lungime, terminată printr-un mîner izolator. Ansa trebuie să fie ușoară, destul de lungă, pentru a se putea preleva material dintr-o eprubetă de 20/200 și destul de subțire, pentru a putea fi mînuită comod într-un tub de hemoliză. Mînerul ansei („port ansă") se poate improviza ușor și avantajos dintr-un fir electric cu conductor unic de aluminiu de 3 mm ∅ (fig. 11).

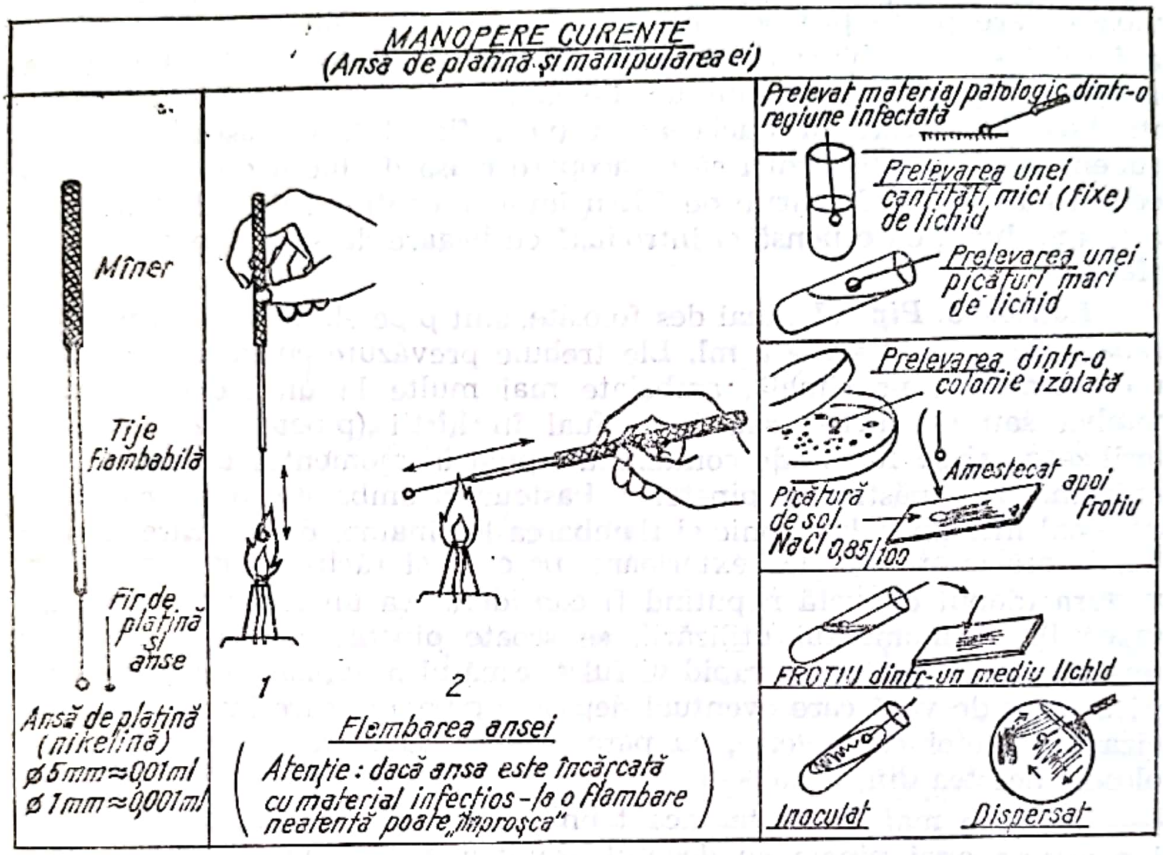


Fig. 11. — Manopere curente de laborator. Ansa de platină și manipularea ei.

O ansă de platină sau de nichelină calibrată cu o buclă de 5 mm ∅, introdusă și scoasă vertical dintr-un mediu lichid (soluție apoasă), prelevă aproximativ 1/100 ml (=0,01 ml), iar una cu un diametru de 1 mm prelevă, în aceleași condiții, aprox. 1/1 000 ml (0,001 ml) de apă, bulion sau altă soluție apoasă.

Pentru întrebuințare, ansa trebuie *flambată* în prealabil, încălzind-o la flacără *pînă la roșu, timp de maximum* 1—2 secunde (nu la alb !) și nu mai mult timp, deoarece este inutil în privința sterilizării și duce la alterarea rapidă a ansei. Flambarea se face ținînd ansa aproape vertical în partea cea mai caldă din flacăra becului de gaz. În continuare, se flambează și tija port ansă, rotind-o și plimbînd-o pe o porțiune care să depășească partea ce ar putea intra într-o eprubetă (vezi fig. 11). După flambare, se așteaptă cîteva secunde pentru răcire (sau se răcește fie în produsul patologic, fie într-un mediu de cultură sau prin prelevarea

unei picături de ser fiziologic steril). După utilizare, ansa se resterilizează prin flambare (ca mai sus) și se pune în stativ.

Niciodată nu se lasă pe masă sau în stativ o ansă nesterilizată în prealabil !

Dacă s-a prelevat o cantitate mai mare de material septic, de consistență crescută, în special o cultură de bacili Koch, introducerea ansei direct în flacără produce printr-o fierbere violentă o împroșcare periculoasă, care poate provoca infecții de laborator. Din această cauză, se va încălzi și usca binișor produsul prin încălzire treptată a firului de platină, începînd cu extremitatea de la port ansă și numai apoi se va introduce în flacără și bucla ansei (vezi fig. 11). De asemenea, este prudent ca în aceste cazuri să se acopere masa de lucru din vecinătatea becului cu o foaie de hîrtie de filtru îmbibată într-un dezinfectant, care va fi apoi luată cu o pensă și introdusă cu băgare de seamă în găleata de infecte.

1.3.7.0.5.3. Pipetele, mai des folosite, sînt pipetele Pasteur și pipetele gradate de 1, de 2 și de 5 ml. Ele trebuie prevăzute cu un dop de vată la extremitatea proximală, ambalate mai multe la un loc (în cilindri metalici sau de hîrtie) sau individual în hîrtii (pipetele gradate). Se sterilizează și se feresc de contaminări pînă în momentul utilizării. Este contraindicată păstrarea pipetelor Pasteur neambalate puse cu capul proximal într-un pahar conic și flambarea lor înainte de utilizare, pentru sterilizarea suprafeței lor exterioare, precum și răcirea lor prin suflare cu gura (dopul de vată neputînd fi considerat ca un filtru bacteriologic perfect !). În momentul utilizării, se scoate pipeta din învelișul ei, se rupe vîrful, se flambează rapid vîrful și capătul proximal, pentru arderea firișoarelor de vată care eventual depășesc pipeta și care împiedică etanșeizarea pipetei cu degetul, cu para, sau cu tubul de cauciuc (dacă se folosesc acestea din urmă).

Dacă se mai folosește încă tehnica „clasică" de a aspira cu gura și a astupa apoi pipeta cu degetul arătător, și aceasta în mod repetat, trebuie de fiecare dată flambată extremitatea proximală înainte de a o introduce în gură, manipulîndu-se pipeta cu 4 degete, păstrînd indexul curat, pentru astuparea capătului proximal al pipetei după aspirarea unui lichid. Recomandăm să se renunțe la aspirarea cu gura și să se folosească fie o pară de cauciuc, fie un tub intermediar de cauciuc prevăzut cu un mușțiuc (fig. 12).

După prelevări, se astupă capătul proximal al pipetelor, fie cu pulpa indexului drept, fie cu vîrful limbei aplicat pe mușțiuc. Pipeta umplută trebuie ținută aproape orizontal, observîndu-se ca nu cumva să picure lichid septic pe masa de lucru sau pe altceva sau ca lichidul din pipetă să ude dopul pipetei. Pentru descărcare, se ține pipeta aproape vertical, se destupă cu băgare de seamă capătul proximal și se lasă să se scurgă lichidul fără să se sufle !

Pipetele după utilizare se cufundă pînă peste partea eventual contaminată într-o soluție dezinfectantă (amestec sulfocromic) sau într-un vas care este trimis la sterilizare.

Scanned with OKEN Scanner

Pipetele gradate se folosesc respectîndu-se aceleaşi reguli. Dacă s-a prelevat sînge, pipetele gradate se cufundă mai întîi într-un vas cu apă (pentru hemolizarea sîngelui) şi apoi în amestecul dezinfectant (sulfocromic). Vasul cu apă trebuie sterilizat după utilizare (atenţie! cilindrii de sticlă se sparg des la sterilizat).

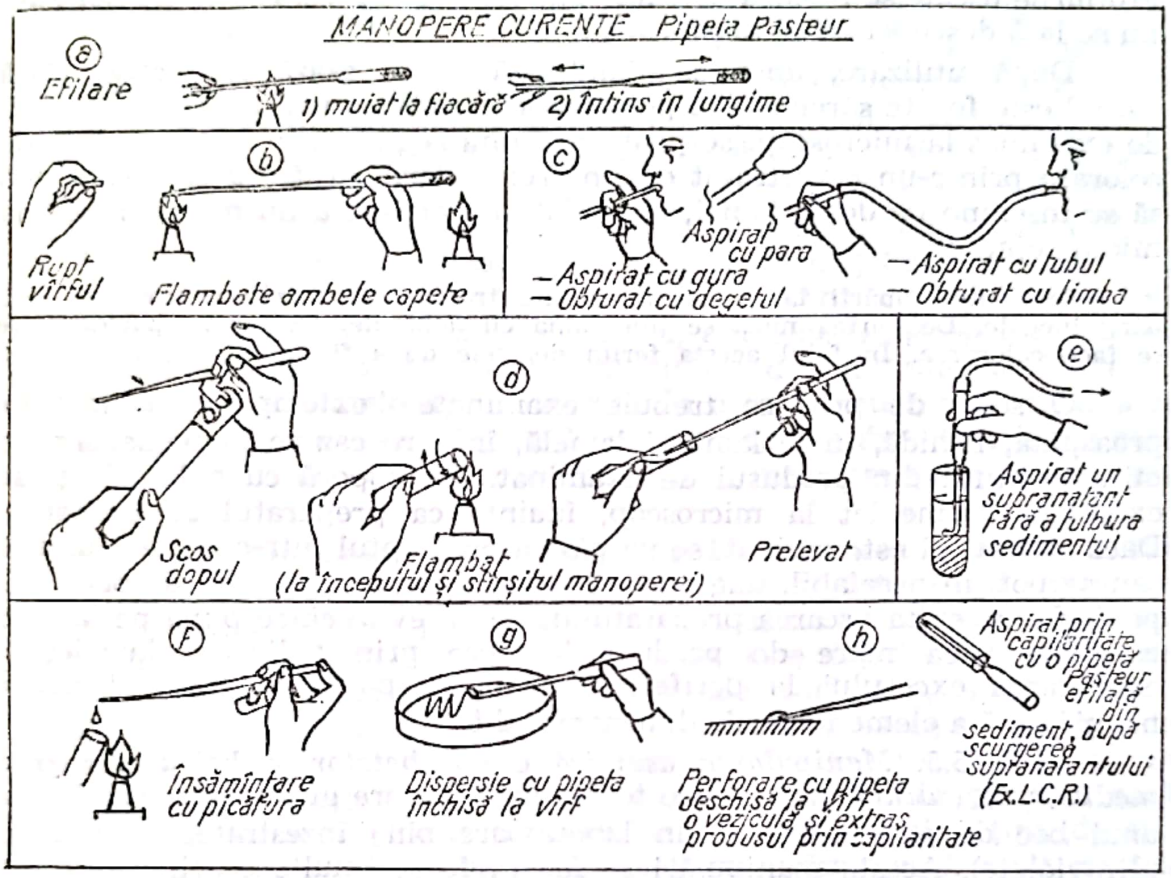


Fig. 12. — Manopere curente de laborator. Pipeta Pasteur şi manipularea ei.

1.3.7.0.5.4. Executarea unui preparat pentru examenul microscopic. Colectarea materialului de examinat se face, după caz, fie direct de la bolnav de la nivelul leziunii, fie din produsul patologic adus la laborator ca atare sau dintr-un sediment de centrifugare. Se pregătesc cel puţin 4 lame curate şi bine degresate.

Dacă produsul de examinat este omogen, se preia o mică porţiune de oriunde, dar dacă nu este omogen se fac prelevări din mai multe locuri, sau se omogenizează produsul, înaintea recoltării. Dacă produsul este foarte opac şi consistent, se face o diluţie în ser fiziologic sau în bulion steril (eventual chiar pe lamă); dacă, dimpotrivă, produsul este limpede sau aproape, se face o centrifugare prealabilă şi se recoltează din sedimentul obţinut.

Frotiul propriu-zis se face, de obicei, cu anse de platină (mai rar cu o pipetă Pasteur sau cu un ac de seringă sau chiar cu un tampon montat). Se flambează ansa, se prelevă o mică cantitate de produs, care

Scanned with OKEN Scanner

se descarcă prin frecare pe lama uscată sau într-o picătură mică de ser fiziologic sau de bulion steril, pusă în prealabil pe lamă, pentru a obține în mod uniform *un strat subțire,* care se usucă imediat la aer (nu trebuie grăbită uscarea prin încălzire și nici nu trebuie să se lase mult timp să se usuce descoperit și neferit de muște sau de contacte contaminante). Frotiurile uscate se fixează ulterior și apoi se colorează. Frotiurile nefixate nu se lasă descoperite pe masă !

După utilizare, ansa se flambează și se așază în stativ. Dacă frotiul este foarte sărac și fin, pentru recunoașterea mai ușoară a regiunii de examinat la microscop, se poate delimita regiunea în cauză înainte de colorare printr-un cerc trasat cu un creion dermograf (nu se recomandă să se însemne pe dosul lamei, ci pe fața ei, pentru a nu murdări platina microscopului).

Se poate împărți lama, printr-o linie trasă cu un creion gros, în două părți inegale. De partea mică se ține lama cu două degete, iar pe partea mare se face colorarea. În felul acesta ferim degetele de a fi murdărite de colorant.

O serie de produse trebuie examinate extemporaneu în stare proaspătă, lichidă, între lamă și lamelă, în care caz se pune pe lamă o mică picătură din produsul de examinat, se acoperă cu o lamelă și se examinează imediat la microscop, înainte ca preparatul să se usuce. Dacă examenul este amînat, se va păstra preparatul într-o cameră umedă sau se pot, în prealabil, unge ușor marginile lamelei cu ulei de parafină, pentru a se evita uscarea preparatului. Se va evita să se pună pe lamă o cantitate prea mare de produs, deoarece prin aplicarea lamelei și expulzarea excesului la periferia lamelei se poate obține o dispersie neuniformă a elementelor de dimensiuni diferite.

1.3.7.0.5.5. Manipularea aseptică a eprubetelor, a baloanelor și a mediilor de cultură etc. se face totdeauna cu mare grijă și în vecinătatea unui bec de gaz (eventual, în laboratoare bine înzestrate, în nișe cu ultraviolete). Aceste manipulări se fac în foarte multe ocazii, ca de ex. în prelevări sau introducerii aseptice de medii de cultură sau alte produse din (sau în) diverse conținătoare sterile, însămînțări de medii, transplante, repicări de germeni, repartizări aseptice de lichide și executarea aseptică de diluții etc. Tehnica de lucru este practic aceeași și implică destuparea aseptică a unui conținător, introducerea și scoaterea aseptică de instrumente (ansă de platină, pipetă etc.), cu care se scoate sau se introduc diverse produse și, în fine, reastuparea aseptică a conținutului, care a fost manipulat. Toate aceste manopere trebuie făcute astfel încît să reducă la minimum pericolul unei contaminări fie către exterior, fie către interiorul recipientului în lucru.

Vom da ca exemplu o prelevare aseptică dintr-o eprubetă (sau balon) (vezi fig. 12). Cu mîna dreaptă, se ia o ansă de platină flambată sau o pipetă sterilă, care se ține ca un creion. Se apucă cu mîna stîngă de fundul ei o eprubetă (sau balon) cu mediu sau alt produs de prelucrat steril. Se apucă dopul eprubetei între degetul mic și podul palmei drepte și se scoate printr-o *mișcare înceată de rotire.* Imediat după destupare, se flambează bine de jur împrejur gîtul eprubetei (pînă ce se duce toată aburеala care se face pe sticlă cînd se introduce în flacără). În felul

Scanned with OKEN Scanner

acesta, se evită contaminări cu firicele de praf sau scame, care se pot desprinde din dopul de vată. Se introduce ansa (sau pipeta) în eprubetă și se culege o cantitate din produsul aflat, apoi se scoate fără să se atingă pereții eprubetei. Se flambează din nou gîtul eprubetei, se astupă la loc și se repune în stativ.

În continuare, ansa poate fi descărcată pe o lamă pentru executarea unui frotiu. Dacă se face un transfer sau o repartizare a substanței în alte eprubete, se continuă operația ca mai sus : luat altă eprubetă, destupat, flambat, introdus, reflambat, reastupat și așa mai departe. Cînd se transferă un lichid cu pipeta, se lasă lichidul să se scurgă prin greutate, nu se suflă, pentru a se evita posibilitatea unei contaminări.

În ultimul timp, este tendința de a se înlocui dopul de vată al eprubetelor cu căpăcele metalice, în formă de degetar, care sînt mai ușor de manipulat și care protejează și fața externă a gîtului eprubetei. O serie de flacoane (cu medii de cultură, antigene, sînge și derivate de sînge etc.) sînt închise în mod steril cu un dop de cauciuc (de tipul dopurilor de la sticluțele de penicilină). În aceste cazuri, manipularea se face cu ajutorul unor ace montate la seringi sau la tuburi sterile, cu care se înțeapă dopul de cauciuc, ceea ce reduce încă mai mult riscul unor contaminări.

1.3.7.0.5.6. Însămînțarea. Recoltarea și însămînțarea constituie actele primordiale ale oricărui diagnostic bacteriologic și, din această cauză, ele trebuie încredințate unor persoane *cu bună calificare* (clinician, tehnician, medic de laborator). Tehnica de însămînțare este diferită, în funcție de produsul de însămînțat (sînge, L.C.R., exsudat faringian, spută, materii fecale, puroi etc.) (Vezi cap. 2 și fig. 11, 13). Trebuie să se țină seama de *numărul* de germeni probabil din produs și de posibilitatea de a avea un produs *plurimicrobian, cu aerobi sau (și) cu anaerobi.* În general, dacă produsul foarte probabil este unimicrobian și cu germeni puțini (de ex., sînge dintr-o endocardită sau septicemie), se însămînțează mult produs în mult mediu lichid. Dacă produsul este probabil mai bogat în germeni (de ex., L.C.R.), se însămînțează eventual și pe un mediu lichid și pe unul solid ; dacă produsul are probabil o floră abundentă (puroi, exsudat faringian, materii fecale etc.), însămînțarea se face pe medii solide, folosind o dispersare a materialului (vezi mai jos), pentru obținerea de colonii separate. În fine, pentru a avea și o informare cantitativă, se pot face diluții din produsul de cercetat, apoi se prelevează un volum fix și se dispersează pe un mediu solid. Numărul coloniilor dezvoltate, înmulțit cu diluția respectivă, indică abundența germenilor.

Indiferent de tehnica folosită, se va respecta cu deosebită grijă tehnica aseptică și manipularea aseptică a conținătoarelor, a mediilor și a instrumentelor folosite (ansă de platină, pipete etc.).

După însămînțare, mediile se pun la termostat pentru incubare.

Cultivarea germenilor strict anaerobi prezintă probleme deosebite, deoarece materialul de însămînțat trebuie ferit cît de mult și bine de un contact cu aerul atmosferic, iar mediul însămînțat trebuie să fie preredus (adică scos oxigenul dizolvat în el) ; reducerea se menține fie prin substanțe reducătoare, fie prin împiedicarea unui nou contact cu aerul

sau prin înlocuirea aerului (cu oxigen) cu un gaz inert și prevăzut cu un indicator de oxidoreducere, pentru a avea dovada că mediul mai este utilizabil. Incubarea se face în atmosferă de azot și CO_2 fără oxigen. Foarte mulți germeni aerobi se pot dezvolta și în anaerobioză, așa încît un germen crescut în anaerobioză nu implică și faptul că el este strict anaerob, invers însă un germen care nu crește pe un mediu bogat în aerobioză, este probabil un anaerob.

Dispersia este folosită pentru a obține colonii separate. O ansă de platină, încărcată cu materialul de dispersat, este descărcată în lichidul de condensare a unui tub cu geloză înclinată, apoi ansa este plimbată în striuri fine și dese, pentru a o epuiza pe suprafața gelozei, fără a o zgîria.

Dacă produsul este bogat și plurimicrobian (de ex., exsudat faringian, spută, puroi, materii fecale etc.), se folosește tamponul montat, care după ce a fost încărcat cu materialul de cercetat este descărcat într-un colț al unei cutii Petri cu un mediu solid potrivit. Apoi, fie cu ansa, fie cu o baghetă de sticlă, eventual cu o pipetă Pasteur nedeschisă la vîrf și îndoită la flacără (riscă mai puțin să zgîrie geloza), se antrenează o mică parte din materialul depus făcîndu-se o serie de striuri paralele într-o regiune învecinată. Din această zonă, se procedează la fel, însămînțînd la fel, pe rînd, încă 2—3 zone (fig. 13). Se obțin, după incubare, colonii confluente în primul sector, apoi din ce în ce mai rare în sectoarele următoare. Se obțin astfel colonii separate (și o oarecare apreciere orientativă asupra abundenței de germeni din produs).

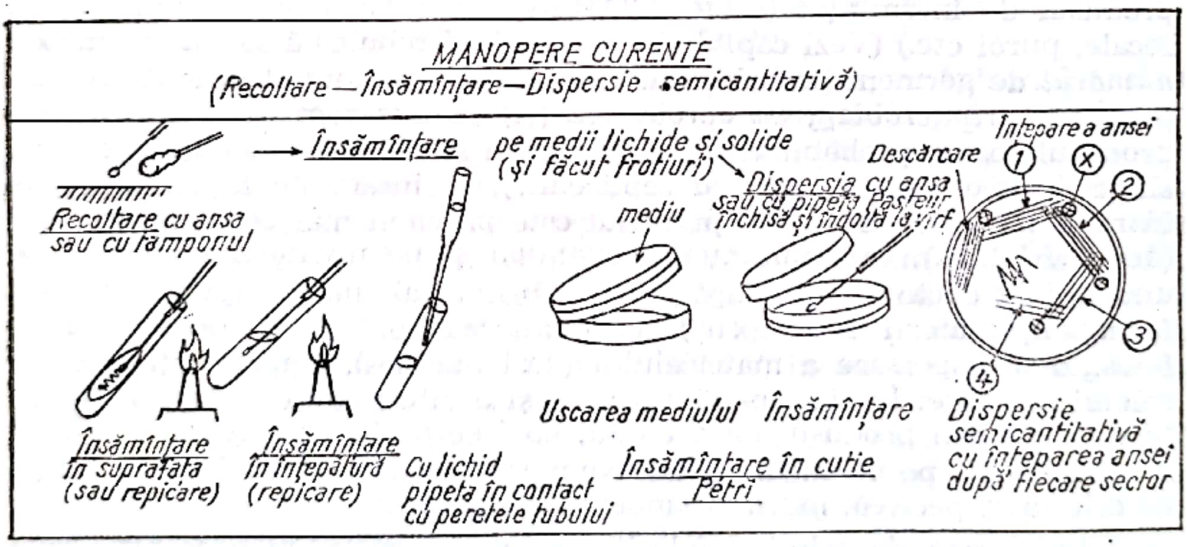


Fig. 13. — Manopere curente de laborator. Recoltări, însămînțări. Dispersie semicantitativă.

Repicare sau transplanturi. Plecînd de la o cultură pură sau de la o colonie izolată, se face o trecere pe medii de cultură proaspete, folosind ansa de platină. Ansa sterilizată prin flambare și răcită este atinsă de colonia de repicat și apoi descărcată prin dispersie pe suprafața unei geloze sau într-un mediu lichid (vezi *1.3.7.0.5.5.* și fig. 11, 12, 13).

1.3.7.0.5.7. Diluții. Pentru aprecierea cantitativă a unor reacții (de ex., serologice) sau a unor substanțe aflate în soluție (de ex., antibiotice), se recurge deseori la determinarea diluției limită, la care un anume fenomen studiat (aglutinare, reacție de culoare, acțiune bacteriostatică etc.) mai poate fi decelat.

Pentru acestea, se folosesc de obicei diluții „binare", și anume : într-o serie de tuburi (sau plăci cu godeuri), se pune cîte un volum (de ex., 0,25—1 ml) dintr-un diluant apropriat (soluție cloruro-sodică izotonă, bulion nutritiv, soluție tampon etc.), peste care se adaugă în primul tub același volum din produsul de studiat. După amestec, se trece cu o pipetă gradată un volum în tubul următor, se amestecă prin barbotare (dar fără a produce spumă sau a uda inutil o suprafață prea mare a pipetei și a tubului în care se face amestecul), apoi se repetă operația pînă la penultimul tub, din care, după amestec, se aruncă un volum. Ultimul tub servește drept martor (fig. 14).

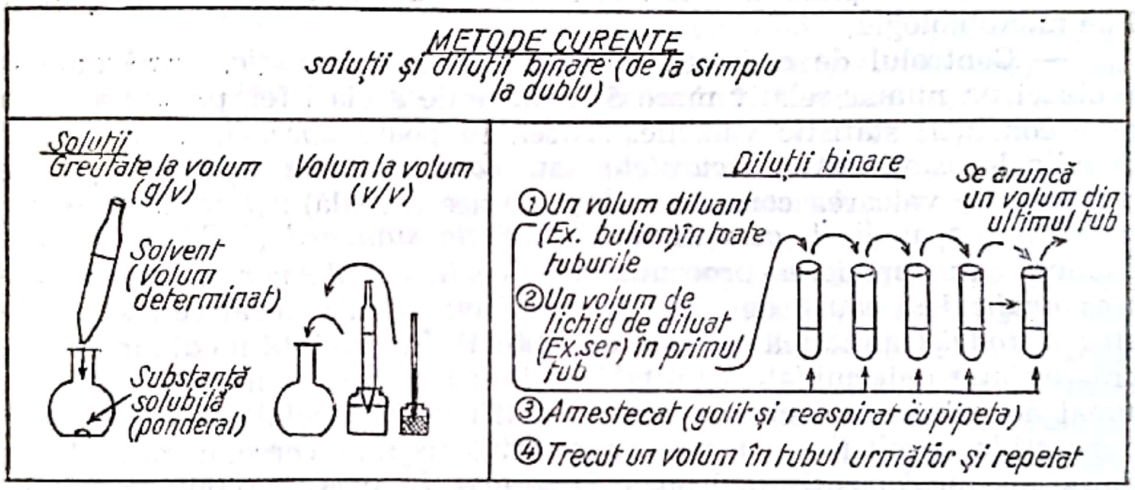


Fig. 14. — Manopere curente de laborator. Soluții și diluții binare.

Pentru a evita antrenarea nedorită cu pipeta a unei cantități oarecare dintr-o diluție mai concentrată într-una mai diluată, se recomandă teoretic schimbarea pipetei la fiecare 1—2 treceri. În practică însă pentru cercetări curente se utilizează o singură pipetă, avînd grijă ca nivelul de lichid aspirat cu ocazia unei barbotări să se ridice ceva mai sus ca în barbotarea precedentă, de fiecare dată cînd se trece de la un tub la altul. Pentru volume mai mici de 0,5 ml, se recomandă să se lucreze cu pipete semiautomate bine calibrate.

În unele laboratoare bine utilate, există dispozitive, care permit obținerea rapidă, în serie și în mod semiautomat, a unor diluții de volume de ordinul 0,1 ml sau chiar mai mici.

1.3.8. CONTROLUL DE CALITATE

Oricare analiză este expusă la multiple *erori :* erori de recoltare, în transportul produsului, în conservarea probei între recoltări și analiză, confuzii în buletine sau produse, erori de investigare, erori în tehnicile

propriu-zise, care au fiecare limitele lor proprii, erori prin calitatea ingredientelor folosite (medii, apă, reactivi, seruri și tulpini de referință, discuri de antibiotice), erori în funcționarea echipamentului mecanic și tehnic (termostat, autoclav etc.), erori în utilizarea martorilor standard etalon (care pot fi alterați și perimați), erori în citirea, în interpretarea rezultatelor.

În afară de erorile citate, mai sînt și altele întîmplătoare, erori „omenești", în executarea analizelor și de aceea se spune, pe drept cuvînt, că valoarea unei analize depinde de conștiinciozitatea aceluia care o execută.

Pentru depistarea și înlăturarea erorilor, se vor face *controale de calitate*, care trebuie să facă parte integrantă din munca de laborator și să constituie o sarcină și o preocupare permanentă.

Pentru controlul de calitate se urmăresc, de regulă, în laboratoarele centrale, 5 parametri. Aprecierea lor este foarte diferită în laboratoarele de biochimie (discipline cantitative) cu acelea din disciplinele morfologice și de microbiologie.

— Controlul de calitate se efectuează prin *sondaje*, urmărindu-se de obicei un număr relativ mare de analize de același fel, pentru a putea trage concluzii statistic valabile. Astfel, se poate aprecia, în special în disciplinele cantitative : *acuratețea* sau *corectitudinea metodei*, (cît de aproape este valoarea constatată, față de aceea reală) ; *precizia* și *reproductibilitatea* analizei, calculîndu-se *deviația standard* (D.S.), în valoare absolută, sau aprecierea procentuală în *coeficient de variație ; specificitatea analizei* și cauze de erori fals pozitive și fals negative ; *sensibilitatea metodei* (cantitatea minimă decelabilă). În privința mediilor de cultură, trebuie determinată cantitatea minimă de germeni „sălbatici" (nu numai de cultură antrenați pe medii artificiale), capabili să se dezvolte. În reacțiile serologice cu martor pozitiv, trebuie cercetat pînă la ce diluție martorul pozitiv mai poate fi decelat. În sfîrșit, trebuie cunoscută *limita de eroare admisă*. Această noțiune are un dublu înțeles, acel al erorii admisibile în laborator, care este legată de tehnică (de ordinul 5—10% în analizele biochimice și putînd merge pînă de la simplu la dublu în analize serologice, în determinări de concentrații minime inhibitorii și bactericide și altele) și limita de eroare legată de valoarea și importanța ei în clinică.

Fiabilitatea înseamnă încrederea care se poate acorda unei analize și are un dublu înțeles : de laborator și (mai ales) în clinică.

— Controlul de calitate se mai face prin introducerea periodică în mod secret („cu cod"), printre analizele curente de „probe interne" în dublu și prin introducerea, tot așa, de „probe externe", în cadrul unor cercetări circulare conduse de centre mari de referință. Analizele cu aprecieri morfologice (sau/și subiective) vor fi de preferință făcute în dublu de 2 cercetători care lucrează independent.

— Controlul de calitate se mai face *comparînd* unele analize între ele (de ex., baciloscopia cu rezultatul culturii ; hematocritul cu dozarea de hemoglobină etc.). Examinarea cu simț critic a unei simple antibiograme clasice poate de multe ori decela o serie de greșeli, care compromit calitatea analizei.

Scanned with OKEN Scanner

— Controlul de calitate în analizele curente elementare se face *repetînd analizele* cu rezultate dubioase, comparîndu-le cu rezultatele obținute în laboratorul central și comparîndu-le cu starea clinică a bolnavului. Trebuie întotdeauna confruntat rezultatul analizelor (chiar dacă au fost făcute ireproșabil) cu datele clinice și, în caz de nepotrivire sau îndoială, trebuie analizat cazul în detaliu.

1.3.9. VALOAREA ANALIZELOR

Din punctul de vedere al clinicianului și al bolnavului, în prescrierea unei analize trebuie avut în vedere cui îi folosește, ce aport practic aduce și dacă merită să fie executată într-un laborator clinic, adică dacă aportul practic cîștigat justifică efortul depus (timp, muncă, reactivi etc.). Valoarea practică a unei analize trebuie apreciată dintr-un triplu punct de vedere și anume :

— *Corectitudinea execuției,* începînd cu valoarea reprezentativă a produsului patologic examinat (recoltare, transport, conservare), continuînd cu executarea propriu-zisă și terminînd cu controlul de calitate. În privința investigațiilor biochimice, problemele sînt mai simple, deoarece intervin mai puțini factori subiectivi, decît în acelea morfologice. Investigațiile serologice și culturale (bacteriologice, virusologice, micologice și parazitologice) sînt mai pretențioase și, din această cauză, ele sînt executate, de obicei, în laboratorul central, de către un personal calificat. Aceste cercetări sînt deseori mai dificil de executat și dau rezultate mai tardive, dar prin valoarea lor de diagnostic, ele sînt indispensabile în studiul infecțiilor. Semnalăm o greșeală gravă, făcută uneori din ignoranță sau din comoditate, dar făcută uneori chiar de microbiologi, aceea de a neglija examenul microscopic morfotinctorial, trecîndu-se de-a dreptul la acel cultural. În produsele plurimicrobiene, nu toți germenii vizibili la microscop vor crește pe mediile de cultură utilizate și, mai ales, nu se va păstra proporția dintre diferitele feluri de germeni. Deseori, tocmai germenii patogeni sînt mai pretențioși și pot să nu crească, în timp ce acei saprofiți se pot dezvolta în voie. Dăm exemplul unui bolnav cu cistită acută, cu o urocultură (pe mediul uzual) negativă, dar cu gonococi în preparatul microscopic al sedimentului urinar. Aprecierea cantitativă a abundenței diferiților germeni din produs, existența de germeni liberi sau fagocitați constituie informații prețioase, care nu pot fi apreciate prin cultura directă.

Simpla evidențiere a unui agent, de regulă patogen și încă mai puțin a unui oportunist într-un produs patogen, nu asigură, în lipsa datelor clinice, în mod neîndoios, rolul lui în boala în cauză. Invers, imposibilitatea de a evidenția un germen, nu exclude, nici pe departe, existența unei infecții.

— *Valoarea informațională* orientativă, sugestivă sau hotărîtoare depinde în largă măsură de contextul clinic. Se va face, de obicei, o ierarhizare a analizelor ; mai întîi, se efectuează analizele rapide și ușor de executat ; apoi analizele care dau informații asupra stării organismului și a tulburărilor organice și metabolice nespecifice ; apoi analizele

Scanned with OKEN Scanner

care dau o suspiciune de infecție ; apoi analizele care dau o suspiciune etiologică ; în sfîrșit, analizele care duc la indicații terapeutice și de control pentru terapia instituită.

— *Valoarea analizei în privința unei sancțiuni practice terapeutice sau antiepidemice.* Din acest punct de vedere, este de multe ori mai util să se ia o atitudine medicală practică pe o suspiciune clinică și de laborator, în bolile grave și acute, decît să se aștepte un rezultat de mare precizie, dar venit prea tîrziu. În bolile cu evoluție rapidă, o analiză venită tîrziu adesea nu mai are nici o valoare.

Colaborarea continuă și eficace și confruntare bilaterală între clinică și laborator și invers va asigura adevărata valoare a analizelor de laborator clinic.

Scanned with OKEN Scanner

2. ANALIZE CURENTE ELEMENTARE DE LABORATOR

2.1. PROBLEME GENERALE

2.1.1. ANALIZE ELEMENTARE COMPLEXE PE PRODUSE PATOLOGICE

În laboratorul clinic central, există o diviziune a muncii și o profilare pe diferite feluri de analize, în vederea creșterii calității și a posibilităților de investigații.

În laboratorul minimal, se caută obținerea prin metode simple a unor informații, care — prin complexitatea lor — să capete astfel o valoare orientativă sau sugestivă mai mare, într-un timp cît mai scurt.

Pentru fiecare *produs patologic*, se va cerceta, după cum am amintit într-un capitol anterior, aspectul macroscopic, microscopic (nativ și colorat), citologic, microbiologic și, eventual, biochimic elementar, precum și determinarea pH-ului. Cercetarea microscopică va cuprinde nu numai descoperirea diferitelor elemente figurate, dar se va face neapărat și o apreciere cantitativă a lor, precum și o apreciere asupra raportului cantitativ între diversele elemente (celule de diferite feluri, detritusuri, fibrină etc., și germeni de diferite feluri). De multe ori, examenul minimal complex trebuie completat cu însămînțări pe medii de cultură și cu recoltare de sînge pentru cercetări serologice, care apoi vor fi executate în laboratorul central.

Alegerea produselor patologice de examinat se face în funcție de tabloul clinic și de suspiciunea clinică. Examenele sumare complexe de sînge și de urină sînt totdeauna indispensabile, deoarece pot furniza o dublă informație : asupra unor eventuale tulburări metabolice sau de funcționare a unor organe sau sisteme și asupra unor eventuale infecții sistemice sau a căilor urinare, în care caz se poate uneori chiar vedea și recunoaște agentul patogen în cauză (mai ales în acelea bacteriene și parazitare).

În toate cazurile, în care se evidențiază sau se bănuie o localizare septică, se va examina, pe lîngă sînge și urină, și *produsul patologic care provine din focarul respectiv*, din imediata lui vecinătate, sau dintr-o scurgere sau secreție care provine de acolo. De ex., la un bolnav cu un sindrom meningian, se va studia lichidul cefalorahidian, la un bolnav cu angină se va examina exsudatul faringian, la unul cu o afecțiune pulmonară se va examina sputa etc.

Pentru a ilustra importanța examenului complex, se pot da nenumărate exemple, unde un examen microscopic morfotinctorial poate

Scanned with OKEN Scanner

asigura un diagnostic de mare prezumţie sau de certitudine, în timp ce examenele culturale de rutină şi biochimice nu pot da nici o informaţie valabilă sau chiar pot îndrepta pe o direcţie greşită (de ex., infecţii cu anaerobi, infecţii parazitare şi micotice, boli de sînge, lupus eritematos visceralizat, procese proliferative etc.). Astfel, în cazul unei angine fuzospirilare, examenul cultural de rutină nu dă nici o informaţie utilă, în timp ce examenul microscopic poate asigura repede diagnosticul corect.

Pentru a ilustra importanţa examenului complex, concomitent al unui produs patologic şi al sîngelui, citǎm cazul anginelor ulceroase din agranulocitoză, leucemii acute şi mononucleoză infecţioasă, unde examenul izolat al exsudatului faringian nu poate fi de folos. Examenul de urină pe lîngă o eventuală afecţiune renală, un eventual diabet, poate decela o infecţie urinară mută, care însă să fie responsabilă de o serie de tulburări la distanţă.

Examenele rapide orientative, deseori în funcţie de rezultatele sugestive obţinute, vor trebui eventual completate de la caz la caz cu alte analize, care cer o aparatură, o tehnicitate şi o profilare profesională mai avansată şi care vor fi executate în laboratorul central sau în laboratoare de profil sau de referinţă.

Examenele rapide simple, dar complexe, pot deseori fi suficiente pentru orientarea clinicianului avizat şi fac astfel inutilă recurgerea la alte analize mai complicate, mai laborioase şi mai încete, care pot greva în mod inutil munca laboratorului central, deseori suprasolicitat.

Buletinul de cerere de analiză, care trebuie să însoţească orice produs (mai ales dacă analiza se face la distanţă, într-un laborator central sau de profil), va cuprinde neapărat : identitatea bolnavului (nume, prenume, pat sau număr de ordine) ; produsul trimis ; data (eventual şi ora) recoltării ; importanţa examenului, sub forma unui indicativ (de ex., *U* = urgent ; *P* = caz-problemă) ; cererea explicită a ceea ce trebuie căutat. Buletinele pot fi diferenţiate, în funcţie de felul analizelor şi de profilele existente în laborator (hematologie, biochimie, microbiologie, parazitologie etc.).

Profilarea în laboratorul central, în orice caz, nu trebuie să facă să se piardă legătura şi colaborarea dintre diferitele profile de laborator şi nici să nu fie aplicată mecanic şi în mod abuziv, în aşa fel încît un produs să fie distribuit în multe locuri, cînd el ar putea fi examinat uşor şi rapid într-un singur loc.

2.1.2. METODOLOGIA DIAGNOSTICULUI INFECŢIILOR

Diagnosticul unei infecţii se bazează pe 5 puncte şi anume :

a) argumente epidemiologice şi clinice ;

b) argumente nespecifice, dar sugestive (leucocitoză cu polinucleoză, creşterea vitezei de sedimentare a eritrocitelor, modificări citologice şi biochimice ale produsului patologic, unele leziuni anatomopatologice etc.) ;

c) argumente specifice, dar indirecte de ordin imunologic ;

Scanned with OKEN Scanner

d) descoperirea unui agent posibil patogen, prin cercetarea morfologică și culturală, apoi identificarea lui ; descoperirea în mod repetat a aceluiași germen și prezența lui în cantitate mare, ca și unele criterii de patogenitate de laborator (de ex., toxigeneză), sînt argumente serioase în favoarea rolului său patogen ;

e) dovada rolului patogen al germenului izolat în cazul de față (criterii de patogenitate).

O serie de *germeni* sînt, de obicei, *patogeni,* după cum a dovedit o lungă și bogată experiență anterioară, producînd boli caracteristice (de ex., febra tifoidă, tuberculoza, sifilisul și foarte multe altele). Simpla prezență a acestor germeni oriunde în organism constituie un semn de alarmă, deoarece pot determina fie boli, fie contagiuni interumane. Coexistența lor cu argumentele de mai sus *a, (b)* și *c* asigură rolul lor patogen în cazul respectiv. În lipsa acestora *(a* și *b),* este doar vorba de un purtător, eventual eliminator.

Alți *germeni* sînt și ei *periculoși,* putînd fi deseori, dar nu totdeauna, patogeni (potențial patogeni) ca streptococul beta-hemolitic, stafilococul coagulazopozitiv etc.

În fine, alți germeni sînt de obicei *nepatogeni,* larg răspîndiți în natură, la animale și oameni. În anumite condiții ecologice și de deficiență a macroorganismului, pot produce boli ; aceștia sînt *germeni condiționat patogeni* sau *oportuniști.*

Se poate bănui rolul patogen al acestor germeni oportuniști, atunci cînd se constată prezența lor în țesuturi, de obicei indemne (sînge, L.C.R., seroase etc.), cu leziuni locale și argumente clinice, cu reacții imunologice specifice față de ei, mai ales dacă apar și evoluează în dinamică. Din regiunile și produsele normal populate cu o floră bogată și variată (tegumente, mucoase exterioare, cavități naturale în legătură cu exteriorul, intestin, salivă, materii fecale etc.), analizele vor trebui în practică să cerceteze prezența (sau absența) eventuală a principalilor germeni patogeni specifici, și — dacă este cazul — să asigure rolul patogenic al unui oarecare oportunist. Pentru aceasta, se va folosi, în plus față de criteriile de mai sus, și criteriul *cantitativ* și *proporțional* (multiplicare *masivă* a unui anume germen și *net preponderentă* față de flora conlocuitoare). Aceasta impune aprecieri și, eventual, cercetări semicantitative.

În *examinarea oricărui produs,* se va face pe rînd o *recoltare corectă, o prelucrare imediată* a produsului, în vederea unei cercetări *morfologice* (macro- și microscopice) și eventual, *însămînțări* pe medii potrivite. Aceste manopere trebuie bine cunoscute de clinician, care deseori, împreună cu medicul de laborator sau singur, sau cu ajutoarele sale, le va executa într-o serie de cazuri.

Analizele citate în prezenta lucrare dau doar *indicații orientative ;* ele vor fi completate, la nevoie, prin tehnici de laborator de specialitate.

Cercetările ulterioare, privind identificarea germenilor, studiul reacțiilor imunologice și asigurarea rolului lor patogen, precum și deseori determinarea sensibilității lor la antibiotice, vor fi executate de medicul de laborator, care va colabora pe parcurs cu clinicianul.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru executarea diferitelor analize, medicii vor consulta excelentele manuale şi materiale tehnice apărute în ultimii ani (vezi bibliografia) şi care ar trebui să nu lipsească din *biblioteca tehnică a laboratorului*, pentru a putea fi oricînd consultate.

2.1.3. CELE TREI ANALIZE MORFOTINCTORIALE MINIMALE DE NEINLOCUIT

Laboratorul clinic, chiar în forma cea mai redusă, limitat doar la cîteva examene sumare de orientare, este totuşi de mare folos. De multe ori, un mare ajutor poate fi dat chiar de ceea ce numim *cele 3 examene morfotinctoriale minimale indispensabile (examenul sîngelui,* al *sedimentului urinar* şi al *produselor patologice, care provin din sau de la focarele infecţioase).*

Aceste 3 examene minimale *sînt de neînlocuit,* în toate situaţiile în care sînt şanse de a descoperi la microscop agenţii patogeni (microbieni, parazitari etc.), responsabili de infecţii sau cel puţin unele aspecte morfologice (eventual citologice), care pot contribui la diagnostic. Aceste situaţii se întîlnesc aproape întotdeauna în infecţiile din serviciile chirurgicale, de terapie intensivă, de urologie, de obstetrică-ginecologie şi de alte specialităţi chirurgicale, precum şi în servicii de pediatrie, de boli interne şi de boli infecţioase (prin boli infecţioase, înţelegem bolile determinate de infecţii, indiferent de numele agenţilor infecţioşi şi de localizare şi, în nici un caz, nu facem confuzia, în parte justificată în secolul trecut, cu bolile transmisibile specifice, care nu reprezintă decît o mică minoritate a infecţiilor actuale).

Cele 3 examene morfotinctoriale minimale obligatorii pot fi executate într-o oră, folosind doar coloranţi uzuali şi un microscop, poate o centrifugă, şi un minim de manualitate. Ele dau rezultate sugestive (uneori chiar de certitudine), care împreună cu informaţiile obţinute prin anamneză, istoric, examen clinic şi paraclinic, pot deveni aproape certitudini, justificînd enunţarea unui diagnostic şi instituirea unui tratament, care poate fi salvator.

Nici o altă analiză, în aceste cazuri, nu le poate înlocui şi nu poate furniza informaţii de o asemenea valoare şi, din această cauză, nefolosirea lor corectă trebuie considerată ca o gravă greşeală profesională.

Reprezentarea schematică a acestor examene morfotinctoriale cu cîteva exemple este redată în fig. 15.

Aceste examene trebuie să cuprindă neapărat *următoarele 3 aspecte:*

a) studiul *calitativ morfotinctorial al tuturor elementelor figurate* (bacterii, fungi, paraziţi, celule de diferite feluri etc.);

b) aprecierea cantitativă globală a acestor elemente, de obicei apreciat în număr „foarte mare", „mare" sau „mic" pe cîmp microscopic, sau elemente „rare" sau „foarte rare", cîte unul la 1, 10 sau la mai multe cîmpuri microscopice;

c) aprecierea proporţională între diferitele feluri de elemente figurative, ca de ex. între coci şi bacili, germeni grampozitivi şi gramnegativi,

Scanned with OKEN Scanner

între fungi şi alte elemente, între germeni şi diferite feluri de celule ; relaţiile citobacteriene şi interbacteriene, în cazul infecţiilor mixte etc.

Vom reveni asupra acestui subiect atît la metodologia diverselor analize pe produse patologice, cît şi la întocmirea buletinului de analiză cito-microbiologic.

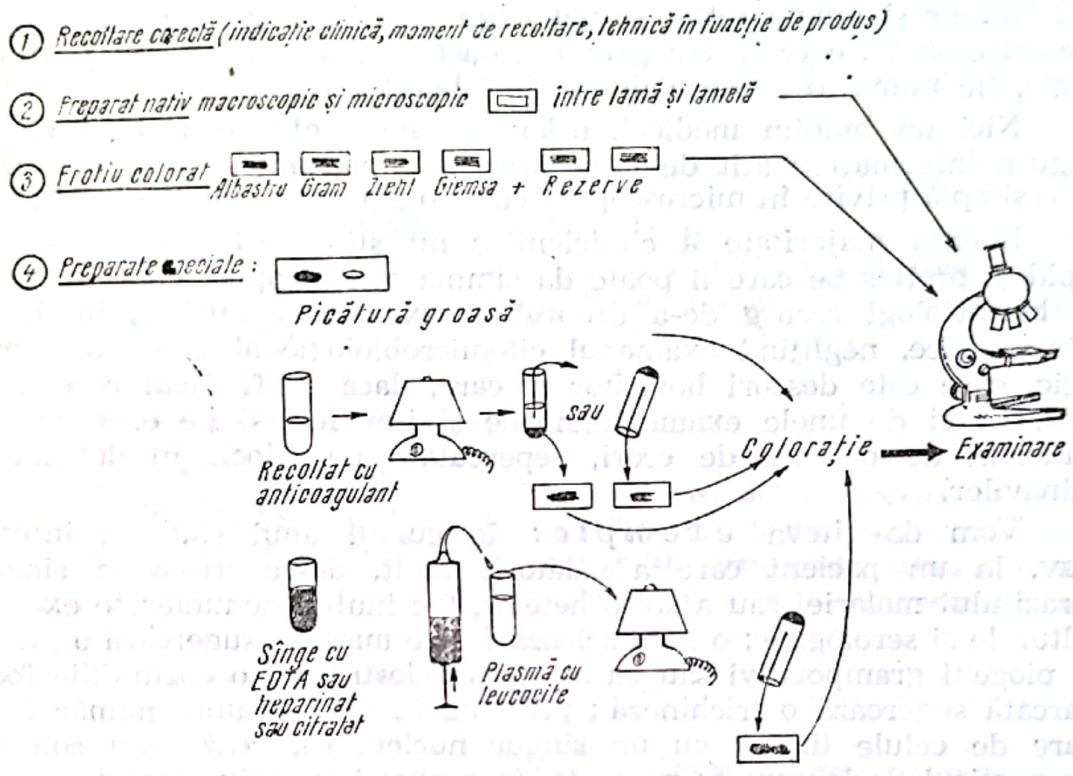


Fig. 15. — Cele trei examene morfologice de neînlocuit : sînge, urină, produs patologic (L.C.R., exsudat, secreţii, colecţii etc.).

Investigaţiile morfologice, directe şi indirecte, macroscopice şi microscopice, urmăresc următoarele *obiective practice : a)* să furnizeze cele mai numeroase şi variate informaţii prezumtive, sugestive sau chiar hotărîtoare pentru o infecţie bacteriană sau nebacteriană (deseori chiar pentru o anume infecţie prin punerea în evidenţă a agentului cauzal) ; sau *b)* dimpotrivă, să orienteze diagnosticul către unele boli neinfecţioase (boală de sistem, boală proliferativă etc.).

Aceste investigaţii morfologice furnizează, deseori, şi informaţii asupra unor modificări patologice organice şi tisulare, precum şi asupra reactivităţii organismului.

Avînd în vedere importanţa covîrşitoare a investigaţiilor morfologice, rapiditatea cu care pot da multiple informaţii, aparatura simplă şi uşor la îndemîna medicilor din unităţile sanitare, recomandăm călduros ca aceste investigaţii să fie folosite din plin şi cu prioritate de toţi medicii implicaţi în recunoaşterea infecţiilor şi a bolilor infecţioase care domină actualmente patologia şi, în primul rînd, de însuşi clinicienii.

Tot aşa cum un clinician ar trebui să facă teste biochimice rapide în ambulator sau la patul bolnavului, sau cum are el obiceiul să exami-

Scanned with OKEN Scanner

neze personal o radiografie, el trebuie să poată executa oricare din examenele morfologice uzuale descrise mai departe. Ei vor putea, ulterior, fi dublaţi la nevoie de medicii specialişti, profilaţi pe anume tehnici.

În felul acesta, se poate asigura o bună confruntare între clinică şi laborator şi numai astfel se pot evita o serie de greşeli sau de interpretări eronate, care se pot produce, dacă se studiază separat fie numai clinic, fie numai o subspecialitate de laborator.

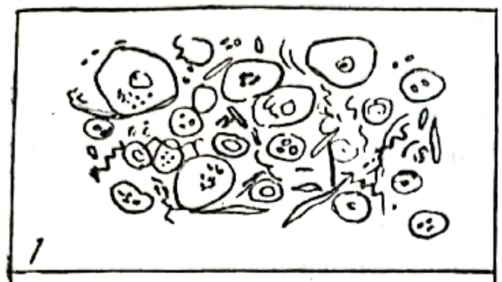
Nici un buletin medical, oricît de amănunţit ar fi el, nu poate asigura informaţiile atît de numeroase şi importante, pe care le poate da o simplă privire în microscop de către o persoană competentă (fig. 16).

Imensa majoritate a clinicienilor nu ştiu să folosească ajutorul rapid şi preţios pe care îl poate da simpla microscopie ; chiar şi o serie de bacteriologi recurg de-a dreptul la examene culturale, biochimice şi serologice, neglijînd examenul citomicrobiologic al produsului patologic, care este deseori hotărîtor şi care, dacă ar fi făcut corect, i-ar scuti pe ei de unele examene inutile şi i-ar feri şi pe ei şi apoi pe clinicieni de o serie de erori, repercutate nemijlocit în detrimentul bolnavilor.

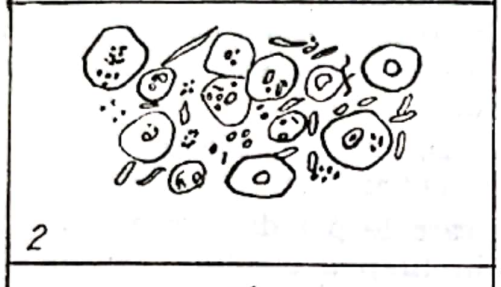
Vom da cîteva *exemple:* în cursul unui sindrom infecţios grav, la un pacient care a călătorit mult, descoperirea în sînge a parazitului malariei sau a spirochetelor, fac inutile nenumărate examene culturale şi serologice ; o polinucleoză foarte marcată sugerează o infecţie cu piogeni grampozitivi sau cu anaerobi (clostridii) ; o eozinofilie foarte marcată sugerează o trichinoză ; prezenţa în sînge a unui număr foarte mare de celule tinere, cu un singur nucleu, sugerează sau confirmă diagnosticul de leucemie ; prezenţa, în proporţie relativ crescută, a unor elemente mononucleare atipice („limfocite monocitoide" ; „virocite") în sînge sugerează o mononucleoză infecţioasă, iar în lichidul cefalorahidian, o „meningită limfocitară benignă", avînd un tablou citologic total deosebit de acela din meningita tuberculoasă ; prezenţa corpusculilor lupici în sînge şi obţinerea fenomenului L.E. *in vitro* indică un lupus eritematos visceralizat. De asemenea, dacă se constată prezenţa unor anumiţi germeni (spirochete, plasmodiul malariei, tripanosome, filarii şi altele în sînge ; leishmanii, bilharsia sau alţi paraziţi într-unul din produsele examinate ; bacili acidoalcoolorezistenţi în L.C.R., la un bolnav cu meningită cu lichid clar etc.), atunci diagnosticul este justificat şi se poate începe un tratament etiologic.

În general, *prezenţa unui germen într-un produs,* care în mod normal trebuie să fie amicrobian, constituie (dacă nu s-a făcut o greşeală de recoltare sau tratare) un puternic argument de diagnostic şi justifică un tratament raţional, alegînd după caz antibiotice active pe coci grampozitivi în grămezi, pe coci grampozitivi în lanţuri sau în diplococi încapsulaţi ; pe coci gramnegativi, pe bacili grampozitivi sau gramnegativi etc.

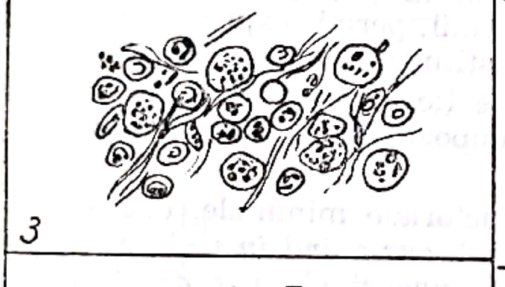
Prezenţa de germeni într-o colecţie poate furniza unele informaţii mai complexe. De ex., germeni liberi, nefagocitaţi într-un produs cu fagocite, poate indica o insuficientă apărare celulară, dar de notat că



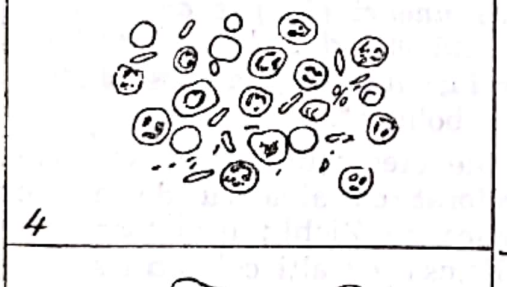
1. *Exsudat faringogingival.* Epitelii, leucocite, numeroşi bacili fusiformi şi spirili gram-negativi : *anghină-stomatită fusospirilară.*



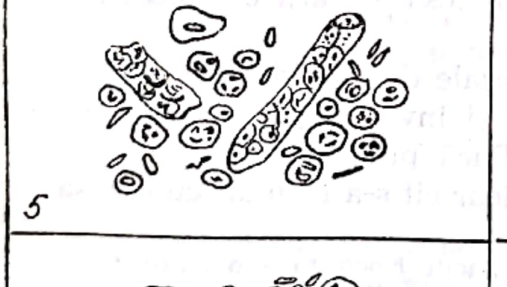
2. *Spută cu secreţii orofaringiene.* Epitelii plate, leucocite, fibrină, floră mixtă (coci şi bacili grampozitivi şi gramnegativi) : *nesemnificativ ! Se va repeta examenul ! Nu se lucrează !*



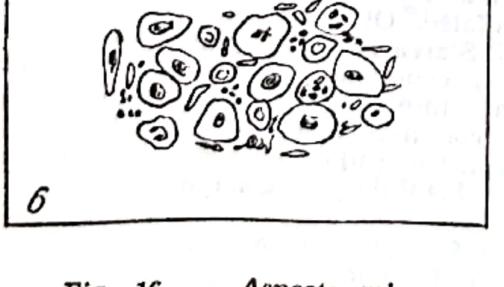
3. *Spută* (veritabilă, alveolară). Numeroase polinucleare, fibrină, rare hematii, macrofage alveolare, floră uniformă (diplococi încapsulaţi) : probabil *pneumonie bacteriană cu pneumococi.*



4. *Materii fecale.* Numeroase leucocite, hematii, fibrină, floră relativ uniformă (bacili gram-negativi) : *diaree prin bacterii invazive* (de ex., Shigella).



5. *Urină.* Numeroase leucocite, cilindrii leucocitari, rare hematii, floră monomorfă (relativ săracă) : *pielonefrită.*



6. *Urină.* Numeroase leucocite, epitelii, celule de descuamaţie vezicală, floră deseori mixtă : foarte probabil, *cistită acută.*

Fig. 16. — Aspecte microscopice sugestive în produse patologice.

acești germeni extracelulari sînt de obicei accesibili la acțiunea antibioticelor.

Dacă se constată germeni intracelulari, aceasta înseamnă că prima fază a apărării celulare este bună, dar rămîne de văzut dacă germenii fagocitați vor putea fi distruși sau dacă, dimpotrivă, ei se pot înmulți și vor duce la distrugerea celulei. Trebuie, de asemenea, reținut faptul că acești germeni fagocitați supraviețuitori, atît timp cît sînt intracelulari, ei sînt la adăpostul acțiunii antibioticelor (poate cu excepția rifampicinei).

Prezența într-un puroi a unei flore extrem de abundente și mixte, cu germeni de diferite forme, dimensiuni și colorabilitate, mai ales dacă produsul este foarte urît mirositor, indică o floră anaerobă, justificînd pe lîngă tratamentul de asanare locală și utilizarea de substanțe antimicrobiene, de obicei active pe acești germeni.

Ilustrăm cîteva exemple, în care aspectul morfologic microscopic este foarte sugestiv sau chiar hotărîtor pentru diagnostic (fig. 17).

Pe lîngă rezultatele imediate, pe care le pot da aceste 3 examene morfotinctoriale minimale, urmărirea în timp a acestor examene citobacteriene permite studierea evoluției bolii, permite aprecierea eficacității (sau a ineficacității) tratamentului instituit și va putea, eventual, surprinde o schimbare a florei microbiene fie prin selecție, fie prin suprainfecție (de ex., dispariția florei grampozitive și înlocuirea ei cu una gramnegativă).

Uneori, cele 3 examene morfotinctoriale minimale, citate mai sus, nu vor fi poate capabile să rezolve cazul, *dar avînd în vedere rapiditatea și ușurința lor de execuție, faptul că uneori ele pot aduce un aport hotărîtor și de neînlocuit prin nici o altă metodă, ele trebuie totdeauna folosite și executate cu mare conștiinciozitate.* Neglijarea sau minimalizarea lor poate uneori costa viața unui bolnav *.

Din orice *produs patologic* trebuie efectuate, pe cît se poate, cel puțin *4—5 frotiuri :* primul este colorat cu albastru de metilen, al doilea cu Gram și, după caz, al treilea cu Ziehl ; următoarele se țin de rezervă, pentru a fi colorate cu Giemsa, cu alți coloranți sau pentru a se repeta colorațiile nereușite.

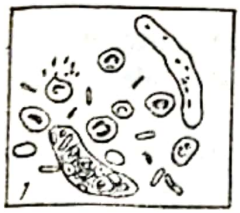
Pe lîngă examenele morfotinctoriale directe, din procesul patologic, de obicei este obligatoriu să se facă și investigații culturale, prin însămînțări pe medii solide și lichide. Dacă produsul patologic recoltat de la bolnav este prea puțin abundent (doar cît s-a recoltat cu o ansă dintr-o

---

* Un bacteriolog care lucrează cu bacili Koch face o stare subfebrilă, cu alterarea progresivă a stării generale, cefalee. Obiectiv, se constată o discretă secreție otică și durere la nivelul mastoidei. Starea generală se alterează și bolnavul devine confuz. Se trepanează mastoida și constatîndu-se un exsudat puriform redus, se suspectează un abces cerebral. Infecționistul (Fl. Căruntu), care a îngrijit inițial bolnavul, face imediat o colorație Gram a exsudatului recoltat și, intrigat de absența polinuclearelor și a bacteriilor, face o colorație Ziehl și descoperă bacili acidoalcoolorezistenți. Se instituie un tratament antituberculos și bolnavul se vindecă.

În acest caz, diagnosticul etiologic a fost pus pe un simplu frotiu, scutind bolnavul de explorări inutile și riscante și de o întîrziere în instituirea corectă a tratamentului, care ar fi putut să-i fie fatală.

Scanned with OKEN Scanner



1. *Urină* (necentrifugată). Leucocite, hematii, bacili gramnegativi, cilindrii: *infecție urinară.*

2. *Urină în schistosomiază*: ouă de *S. haemolobium* și hematii.

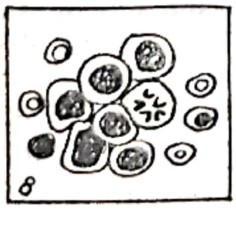
3. *Spută.* Fibrină, leucocite, bacili acido-alcoolo-rezistenți: bacili Koch — *tuberculoză pulmonară.* De căutat cu răbdare și atenție!

4. *Lichid cefalorahidian.* Diplococi grampozitivi încapsulați: *meningită cu pneumococi.*

5. *Puroi.* Coci grampozitivi în grămezi: *stafilococ.*

6. *Puroi* cu anaerobi și floră mixtă (bacili gramnegativi și grampozitivi sporulați, încapsulați).

7. *Secreție uretrală.* Diplococi gramnegativi: *uretrită gonococică.*



8. *Lichid pleural.* Placard de celule tinere, intens bazofile, cu mitoze (poate neoplasm). De consultat un anatomopatolog-oncolog.

Fig. 17. — Unele aspecte microscopice sugestive sau patognomonice în produse patologice diverse.

Scanned with OKEN Scanner

leziune, o mică picătură de puroi sau ce a rămas pe acul de puncție etc.), acesta va fi omogenizat într-o cantitate minimă de bulion steril, din care se fac apoi frotiuri și culturi.

Unele lichide patologice conțin multă fibrină (de ex., lichid pleural), care se coagulează repede, împiedicînd executarea unor frotiuri reprezentative ; din această cauză, lichidul de puncție pleurală se va descărca din seringa de puncție într-o eprubetă cu 0,5—1 ml citrat de sodiu 3,8/100 ml (steril).

Într-o serie de infecții, aceste 3 examene — deși indispensabile — nu sînt suficiente și trebuie să se recurgă la o serie de alte cercetări pentru *cultivarea și identificarea germenilor* izolați, aprecierea rolului lor patogenic, precum și deseori *determinarea sensibilității lor la antibiotice.*

Studiul agentului izolat cuprinde, pe rînd, aprecierea rolului patogen în cazul respectiv, aprecierea dacă utilizarea unui tratament antimicrobian poate fi sau nu în folosul bolnavului în cauză și, în fine, aprecierea nevoii de a determina (sau nu) sensibilitatea germenului *in vitro* la substanțe antimicrobiene. Aceste cercetări pot fi dictate de interesul terapeutic sau de acel al unor studii epidemiologice, statistice, sau de interes științific.

Avînd în vedere profilul prezentei lucrări, ne vom ocupa numai de primul punct, acel al interesului terapeutic, recunoscînd însă importanța practică a informațiilor primite de pe urma cercetărilor epidemiologice, statistice și științifice (în special, acelea referitoare la factorii plasmidieni de rezistență). La acestea, se vor adăuga informațiile primite din literatură și din experiența clinică și, în special, acelea privitoare la studii comparative făcute în diferite scheme de tratament în situațiile mai des întîlnite.

2.2. ANALIZE SUMARE DE SÎNGE

(Pentru orientarea diagnosticului în infecții și pentru unele informații hematologice elementare)

Examenele elementare de sînge, care pot fi executate într-un laborator minimal, de către un clinician conștiincios, sînt destul de numeroase : examene *morfologice* cu formulă leucocitară, *numărători de elemente, dozare de hemoglobină, hematocrit, viteza de sedimentare a eritrocitelor, fenomenul L. E., probe simple de coagulare,* unele *probe simple imunologice și hemoculturi.*

Din cele peste o sută de analize posibile, cele mai simple, mai utile și de o mai mare valoare informativă, din punct de vedere al infecționistului, sînt fără îndoială, în primul rînd, examenul atent morfologic al sîngelui și, apoi, în mai mică măsură, numărătoarea de leucocite, viteza de sedimentare a eritrocitelor și hemocultura. Restul analizelor, de mai largă utilizare și care nu cer o tehnicitate deosebită, se pot reduce la 10—15.

Recoltarea sîngelui poate fi făcută, pentru *sîngele capilar,* din pulpa degetului, din lobulul urechii sau din călcîi la sugari. Din sîngele

capilar, se pot face : *examene morfologice* (frotiu, picătură groasă), numărători de elemente, dozare de hemoglobină (metoda Sahli) şi, dacă există o anumită înzestrare, şi hematocritul şi unele examene biochimice, folosind micrometode speciale (fig. 18).

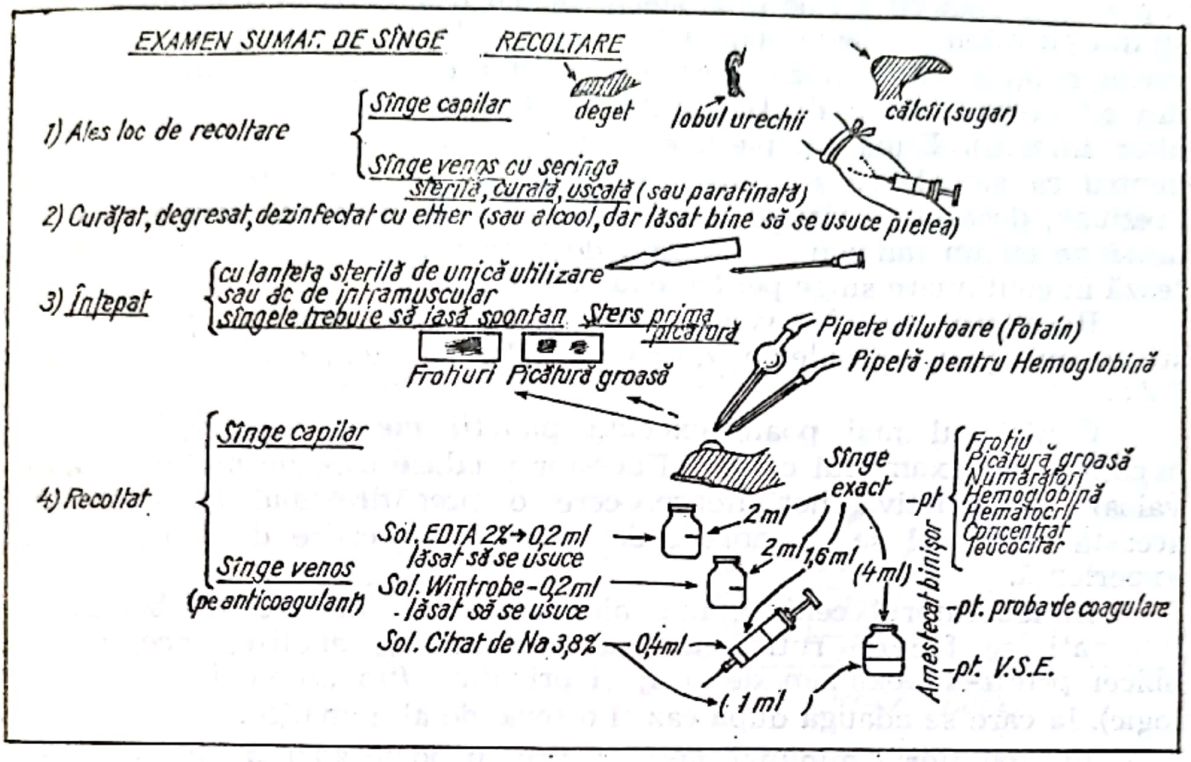


Fig. 18. — Examenul sumar de sînge. Recoltări.

Recoltarea sîngelui venos se face cu o seringă bine etanşată, perfect curată, sterilă şi uscată. Pentru unele probe hematologice şi biochimice, se poate lăsa să curgă sîngele din ac de-a dreptul în eprubete sau flacoane. Pentru hemoculturi, se recurge fie la o seringă, fie mai bine, la sisteme închise (vezi cap. 2.2.5.).

Din sîngele venos, se pot face analizele de mai sus şi în plus probe pentru explorarea hemostazei, VSE, fenomenul L.E.

Sîngele poate (deseori trebuie) fi recoltat pe anticoagulanţi (EDTA uscat), pentru mai toate examenele hematologice curente, cu excepţia vitezei de sedimentare a eritrocitelor (VSE), a probelor de coagulare, şi cu observaţia că examenele morfologice se fac mai bine din sînge nativ. Ca anticoagulant uscat, se utilizează un amestec de *oxalaţi* (Wintrobe), pentru explorarea hemostazei, şi soluţie 3,8/100 *citrat de sodiu*, pentru VSE (vezi *Anexa 3*).

Pentru determinarea fenomenului L.E. (vezi *2.2.1.0.4.*), sîngele poate fi recoltat şi defibrinat prin agitarea cu perle de sticlă (agitaţia cu perle corespunde triturării cheagului din alte tehnici).

Recoltarea se face de preferinţă dimineaţa pe nemîncate, dar la nevoie oricînd, sau la anumite ore, cînd se suspectează o periodicitate anumită a unor agenţi patogeni, ca în septicemii, malarie, filarioză etc.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru recoltare, locul respectiv se curăță bine, se degresează, și se dezinfectează cu eter sau eventual cu alcool rectificat (nu medicinal), cu condiția ca pielea să fie perfect uscată în momentul recoltării.

Pentru recoltarea sîngelui capilar, se înțeapă pielea printr-o mișcare rapidă și fermă cu un ac gros steril sau cu o lanțetă sterilă individuală, ținută cu mîna sau adaptată la un nou tip de ac Francke (acul Francke clasic, neputînd fi sterilizat, în mod curent și corect, nu se mai utilizează, din cauza pericolului de transmitere a hepatitei virale B și poate și a altor infecții). După înțepare, care trebuie să fie destul de profundă, pentru ca sîngele să iasă în mod spontan (sau după o foarte ușoară presiune, deoarece altfel se falsifică rezultatul), se șterge prima picătură de sînge cu un tampon sau bucată de vată uscată și sterilă și se recoltează în continuare sînge pentru examenele necesare.

Recoltarea sîngelui venos, nativ, pe anticoagulant sau pe perle de sticlă, nu pune probleme deosebite. Pentru hemoculturi, vezi cap. *2.2.5.*

Clinicianul mai poate executa *puncții medulare, ganglionare* și *hepatice*, dar examenul corect al acestor produse care de multe ori au o valoare informativă hotărîtoare, cere o pregătire mai bună și, din această cauză, el se va adresa de obicei unor cadre de laborator cu experiență.

În laboratorul central, mai ales în funcție de profilul bolnavilor internați, se fac de rutină un număr mare de analize, începînd de obicei printr-un examen de triaj și orientare (un „screening" hematologic), la care se adaugă după caz și o serie de alte analize.

În laboratorul minimal, medicul tratant poate adopta, cunoscîndu-și bolnavul și simptomele prezentate de el, o atitudine mai economică și mai eficace, eșalonîndu-și examenele, în sensul că primele pot fie indica alte investigații complementare, fie dimpotrivă exclude altele. De ex., simpla recoltare de sînge și urmărirea sîngelui recoltat într-o eprubetă pentru reacții biochimice sau serologice permite uneori să se recunoască grave tulburări de hemostază-coagulare, care altfel nu ar fi fost descoperite decît mai tîrziu sau prea tîrziu.

Medicul tratant trebuie să facă neapărat un *examen morfologic al frotiului de sînge* și o *numărătoare de leucocite*. Aceste examene făcute bine și conștiincios au o deosebit de mare valoare informativă, precum și de indicație și control. pentru o serie de alte analize.

2.2.1. EXAMENUL MORFOLOGIC AL SINGELUI

2.2.1.0.1. Examenul frotiului de sînge cere o tehnică ireproșabilă, în privința pregătirii materialelor (lame perfect curate și degresate), curățirea, degresarea și dezinfectarea locului de recoltare, precum și executarea frotiului.

Se vor folosi 4—5 lame de sticlă, perfect curate și perfect degresate, pe care se fac frotiurile. Pentru întins sîngele în strat subțire și uniform, se folosește o lamă de sticlă șlefuită cu unul din colțuri ciobit. Lamele se manipulează ținîndu-le numai de muchii, pentru a nu murdări

feţele. După înţeparea pulpei degetului, în aşa fel încît să iasă spontan o picătură de sînge, se şterge prima picătură, apoi se recoltează o a doua picătură mică de sînge (cît un bob de grîu), pe mijlocul laturii ciobite a lamei şlefuite, evitînd să se atingă degetul bolnavului (dacă se lucrează cu sînge recoltat pe EDTA, după agitarea şi omogenizarea sîngelui, se pune către capătul drept al unei lame de sticlă o mică picătură de sînge, care va fi întinsă apoi cu lama şlefuită). În ambele cazuri, sîngele se întinde la fel : se aplică lama şlefuită pe lamă ca să atingă picătura de sînge, se lasă sîngele să se întindă prin capilaritate între muchia lamei şlefuite, ţinută într-un unghi de aprox. 45°, şi faţa lamei portobiect şi apoi, printr-o mişcare uniformă şi fără a apăsa, se antrenează de la dreapta spre stînga sîngele într-un strat subţire şi uniform pe suprafaţa lamei (fig. 19).

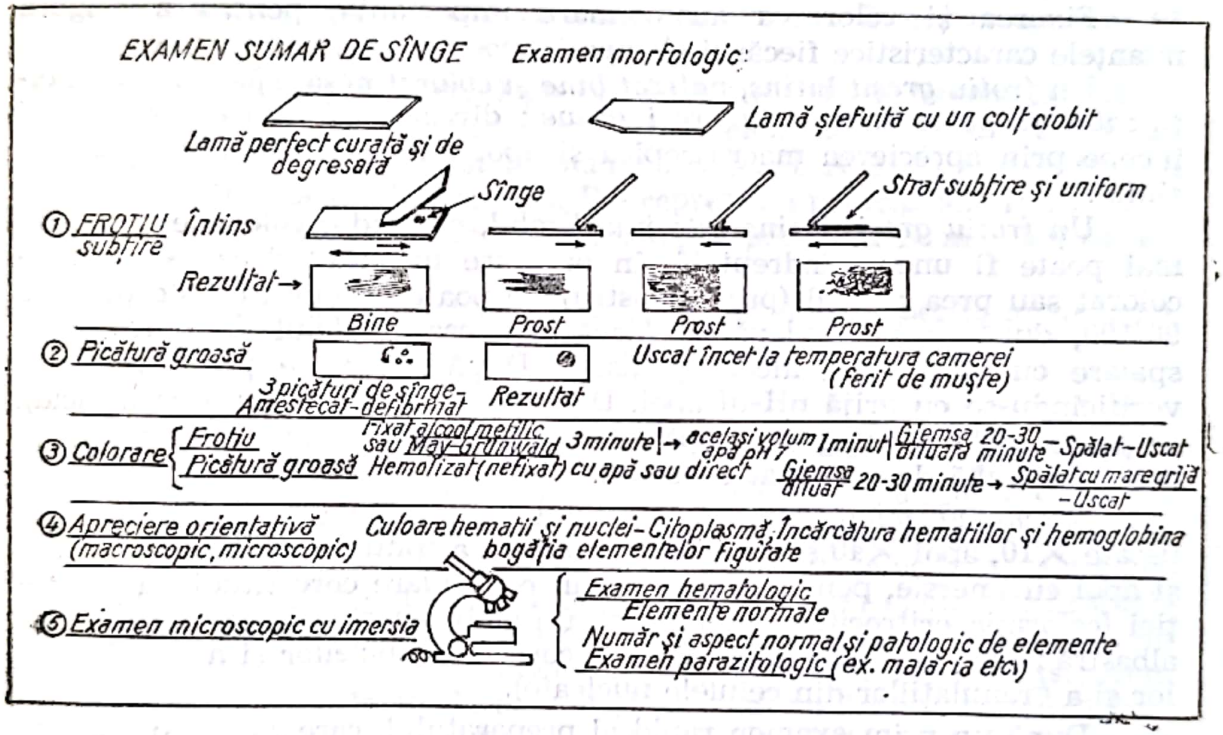


Fig. 19. — Examenul sumar de sînge. Examenul morfologic.

Sîngele sărac în elemente trebuie întins mai încet ; iar cel mai bogat — mai repede. Sîngele trebuie întins într-un strat subţire şi uniform, care să nu ajungă pînă la nici una din cele patru margini ale lamei. La microscop, elementele din mijlocul frotiului trebuie să fie uniform răspîndite, abia confluente, dar nu suprapuse ; ele trebuie să fie despărţite prin mici spaţii clare, mai mult sau mai puţin egale între ele.

Pe laturi, la terminarea frotiului, se constată, de obicei, o abundenţă mai mare de elemente nucleate şi, dacă este cazul, de paraziţi unicelulari.

Capătul frotiului nu trebuie să aibă franjuri mari, deoarece indică, deseori, fie un frotiu greşit întins, fie o lamă insuficient degresată, fie

prezența de mici cheaguri. Imediat după întindere, lama va fi puternic agitată, pentru a grăbi uscarea, deoarece altfel elementele se ratatinează.

După uscare, se notează cu un creion obișnuit (nu chimic sau gras) sau se zgîrie cu acul identitatea bolnavului, chiar pe frotiu. Lamele vor fi ferite de muște, vor fi uscate, fixate și apoi colorate.

*Colorarea frotiului de sînge**. Pentru examenul morfologic și decelarea eventuală a unor agenți patogeni (bacterii și paraziți) se folosește *coloratia Giemsa* sau *May-Grünwald-Giemsa* (vezi *1.3.7.0.2.4.)* sau, mai puțin satisfăcător pentru morfologia sîngelui, dar mai rapidă, *coloratia Field* (vezi *1.3.7.0.2.5.*). În unele cazuri rare, cînd se caută pe frotiul de sînge sau în picătura groasă eventuale bacterii, se recurge și la alte colorații, ca de exemplu Gram (vezi *1.3.7.0.2.2.)*. (Pentru colorații vezi și *Anexa 2*).

Fixarea și colorarea au o mare importanță, pentru a asigura nuanțele caracteristice fiecărui element.

Un frotiu greșit întins, nefixat bine și colorat nesatisfăcător este inutilizabil și poate induce la erori grave; din această cauză, examenul începe prin aprecierea macroscopică și apoi microscopică a calității frotiului.

Un frotiu greșit întins este inutilizabil, pe cînd o colorație nereușită mai poate fi uneori îndreptată, în oarecare măsură ; dacă este supracolorat sau prea bazofil (prea albastru), se poate decolora cu alcool etilic 90/100, după ce s-a îndepărtat (dacă este cazul) uleiul de cedru, prin spălare cu xilol, apoi alcool și uscat. După aceea, se poate recolora, verificîndu-se cu grijă pH-ul apei. Dacă preparatul este prea roșu (acid), se poate spăla prelung cu o apă ușor alcalină sau cu apă alcalinizată cu o soluție slabă de carbonat de sodiu.

Examenul microscopic al frotiului se face mai întîi cu obiective uscate ×10, apoi ×40 și cu ocular 7, pentru a controla calitatea frotiului, și apoi cu imersie, pentru a controla în continuare corectitudinea coloratiei (coloratia eritrocitelor trebuie să fie gălbui-portocalie, nici roșie nici albastră ; trebuie controlată coloratia corectă a nucleilor și a citoplasmelor și a granulațiilor din celulele nucleate).

După un prim examen rapid al preparatului, care să dea o imagine generală a sîngelui, se trece la un examen mai în detaliu, care va fi oarecum deosebit, în funcție de examinator : hematologul va studia elementele sanguine, parazitologul — paraziții, iar clinicianul, dacă face chiar el examenul sîngelui, la un anume bolnav deosebit, după cum recomandăm noi, se va axa diferențiat și uneori chiar țintit, în funcție de probabilitatea clinică, pentru a cîștiga — pe de o parte — informații asupra stării de reactivitate a bolnavului, iar — pe de altă parte — pentru a descoperi eventual unii agenți patogeni sau o modificare caracteristică lor.

---

* Aceleași tehnici de colorare, ca pentru sînge, se folosesc și pentru cercetări bacteriologice și parazitologice, în *examenul sucului* sau *amprentelor din ganglionii limfatici sau din măduva osoasă,* precum și din *punctiile bioptice din ficat* și din *punctia intraoperatorie din splină.* Pe lîngă coloratiile pentru sînge, se mai utilizează coloratiile : Gram, Ziehl, albastru de metilen și, după caz, diferite coloratii de histopatologie.

Credem că cererea clasică „N.L." (numărătoare de leucocite) şi „F.L." (formulă leucocitară) ar trebui înlocuită prin „examen morfologic de sînge şi formulă leucocitară". Simpla cerere de formulă leucocitară incită pe medicul de laborator să neglijeze celelalte elemente, care se pot afla în sînge şi, astfel, se explică cazul unui bolnav celebru, care a murit de malarie, cu toate că avea o formulă leucocitară nesugestivă.

Examenul morfologic al frotiului se face, ca şi examenul clinic, respectînd întotdeauna aceeaşi ordine (seria eritrocitară, seria trombocitară şi seria leucocitară, germeni şi paraziţi dacă există).

Avînd în vedere că, în mod normal, numărul eritrocitelor este de aprox. 1 000 de ori mai mare decît acel al elementelor nucleate, dacă urmărim 100—200 de leucocite în sîngele periferic, vor trece prin cîmpul microscopului aprox. 100 000—200 000 de eritrocite, care trebuie să fie şi ele urmărite şi nu trecute cu vederea, cum se face adesea cînd se urmăreşte doar formula leucocitară.

Pentru examenul morfologic al sîngelui, este indispensabil să se cunoască mai întîi *caracterele normale ale elementelor figurate care se găsesc în sîngele periferic (şi în măduva osoasă).* Acestea sînt redate în mod succint în tabelele VII şi VIII. Ele reprezintă principalele formaţiuni, care pot fi constatate mai frecvent în sîngele periferic, în măduva osoasă şi în sucul ganglionar.

De notat că „graniţa" dintre măduvă şi sîngele periferic se poate deplasa în anumite limite şi condiţii, fie spre stînga (elemente mai tinere), fie spre dreapta (elemente mai bătrîne).

2.2.1.0.1.1. Seria eritrocitară. Se vor studia : dimensiunea, forma şi culoarea (încărcătura cu hemoglobină) eritrocitelor. De asemenea, se notează dacă eritrocitele prezintă resturi nucleare, granulaţii sau dacă conţin (eventual) paraziţi. Citäm, printre eritrocitele anormale : *anulocite,* în anemiile hipocrome ; *megalocite,* în anemiile megalocitare ; *sferocite,* în unele boli ereditare şi în unele anemii hemolitice ; *ovalocite,* în unele anemii hemolitice ; *hematii în ţintă,* deseori în talasemii ; *hematii în picătură,* în sindromul de mielosclerozä cu metaplazie mieloică (sindrom M.M.M.) ; *schizocite,* în unele anemii şi în sindromul de coagulare intravasculară diseminată ; *anizocitoză* şi *poikilocitoză,* în toate formele de anemie, nefiind caracteristice pentru o anume boală sau sindrom.

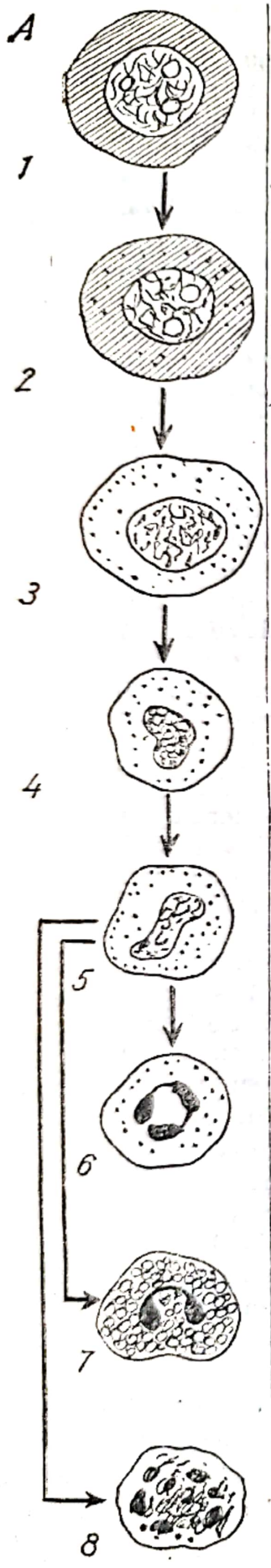
Uneori, în sînge se poate constata prezenţa de *eritroblaşti* (normoblaşti), care sînt forme tinere nucleate de eritrocite. Eritroblaştii nu apar în sîngele periferic în mod normal. Prezenţa lor în sîngele periferic este patologică, şi anume : dacă apar însoţiţi de un număr crescut de reticulocite indică o eritropoieză hiperactivă, ca în anemiile hemolitice ; dacă apar cu un număr scăzut de reticulocite, eritroblaştii sînt mesagerii unei insuficienţe medulare, din cauza unui proces proliferativ intramedular, cum ar fi o leucemie acută, metastaze osoase de carcinom, mielom multiplu.

În cursul unor boli febrile, la bolnavii proveniţi din zone calde şi oricînd se suspectează sau este posibilă o parazitoză, se cercetează cu atenţie prezenţa de *paraziţi intraeritrocitari* (malaria, babesia etc.).

Scanned with OKEN Scanner

Schemă simplificată a celulelor din măduvă și din sângele periferic

A. SERIA GRANULOCITARĂ

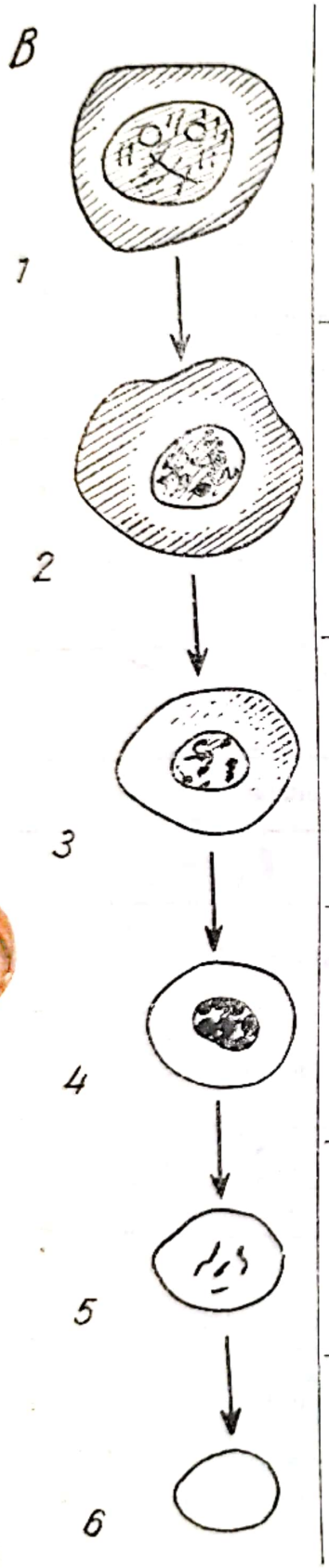


1. *Mieloblast*	12—18 μm Nucleu mare, central Cromatină fină Nucleoli 1—4 Citoplasma intens bazofilă, fără halou perinuclear Nucleu > Citoplasmă Seamănă cu proeritroblastul
2. *Promielocit*	12—20 μm Nucleu central Cromatina granulară Nucleoli 1—4 Citoplasma intens bazofilă Granulații azurofile, sferice, inegale Nucleu > Citoplasmă
3. *Mielocit*	12—18 μm Nucleu rotund sau ovalar Cromatina relativ densă Nu are nucleoli Citoplasma roz sau slab bazofilă Granulații prezente : neutrofile sau eozinofile sau bazofile Nucleu = Citoplasmă
4. *Metamielocit*	10—16 μm Nucleu rotund, mai des ovalar Cromatina mai densă Nu are nucleoli Citoplasmă roz Granulații prezente : neutrofile sau eozinofile sau bazofile Nucleu < Citoplasmă
5. *Nesegmentat*	10—15 μm Nucleu reniform sau în S Cromatina densă Nu are nucleoli Citoplasma roz Granulații prezente : neutrofile sau eozinofile sau bazofile Nucleu < Citoplasmă
6. *Segmentat neutrofil*	10—15 μm Nucleu cu 2—4 lobi Cromatină densă Nu are nucleoli Citoplasma roz Granulații numeroase pulverulente (uneori granulare) neutrofile (colorate în violet) Nucleu < Citoplasmă
7. *Segmentat eozinofil*	10—17 μm Nucleu cu 2—3 lobi Cromatina densă Nu are nucleoli Citoplasma abia vizibilă (roz) Granulații mari, sferice, refringente, acidofile (roșii) Nucleu < Citoplasmă
8. *Segmentat bazofil*	10—13 μm Nucleu incizat Cromatina densă Nu are nucleoli Citoplasma roz, uneori cu vacuole Granulații mari, neregulate, bazofile care uneori maschează nucleul Nucleu < Citoplasmă

Scanned with OKEN Scanner

(continuare tabelul VII)

B. SERIA ERITROCITARĂ



1. *Proeritroblast*
   - 14—19 μm
   - Nucleu mare, rotund
   - Cromatina fină
   - Nucleoli
   - Citoplasma bazofilă, cu halou clar perinuclear
   - Nucleu > Citoplasmă

2. *Eritroblast bazofil*
   - 12—17 μm
   - Nucleu mare, rotund
   - Cromatina fină, dar în grămezi pe alocuri
   - Nu are nucleoli
   - Citoplasma intens bazofilă, cu halou perinuclear
   - Nucleu > Citoplasmă

3. *Eritroblast policromatofil*
   - 12—15 μm
   - Nucleu rotund
   - Cromatina în blocuri
   - Nu are nucleoli
   - Citoplasma albăstruie-cărămizie (începe să se încarce cu hemoglobină)
   - Nucleu = Citoplasmă

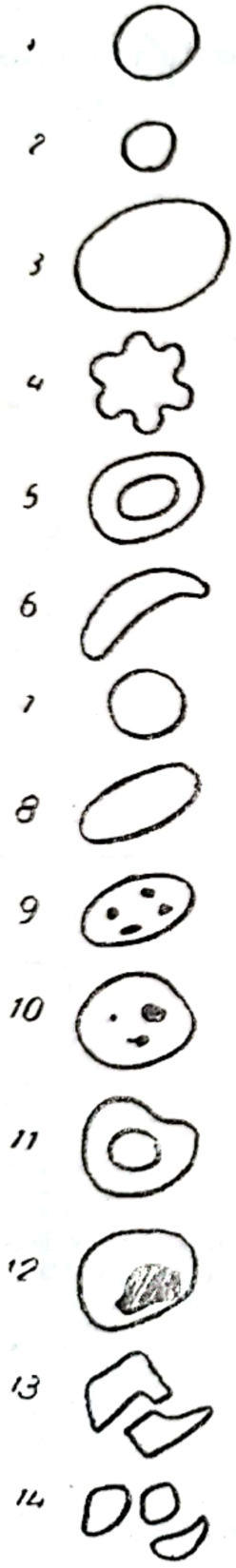
4. *Eritroblast oxifil*
   - 8—12 μm
   - Nucleu rotund, picnotic
   - Nu are nucleoli
   - Citoplasma oxifilă (ca a eritrocitelor)

5. *Reticulocit*
   - 7—10 μm
   - Nu are nucleu
   - Elemente granulare sau filamentoase, evidențiabile prin colorare cu brilliant cresyl-blau
   - Citoplasma oxifilă (ca a eritrocitelor)

6. *Eritrocit*
   - 7 μm
   - Nu are nucleu
   - Nu are granulații
   - Rotund, biconcav
   - Citoplasma oxifilă (galben-roșiatică)

(continuare tabelul VII)

C. ERITROCITE ANORMALE

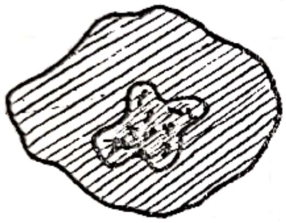


1. Eritrocit normal
2. Microcit (în anemii feriprive)
3. Megalocit (în anemia Biermer)
4. Crenelat (în anemie)
5. În țintă (în talasemie)
6. În seceră
7. Sferocite (în sferocitoza congenitală)
8. Eliptocite (în anemia Biermer)
9. Granulații bazofile (în intoxicația cu plumb)
10. Corpi Howell-Jolly (în anemii severe)
11. Inele Cabot (în anemii severe)
12. Eritroblaști (în anemii severe)
13. Schizocite (în anemii hemolitice, în CDI)
14. Anizocitoză și poikilocitoză (în anemii severe)

Scanned with OKEN Scanner

(continuare tabelul VII)

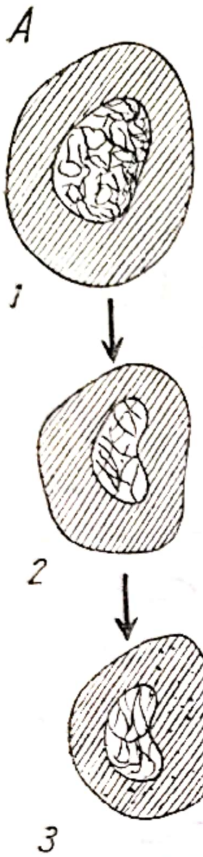
D. SERIA TROMBOCITARĂ

D 1	1. *Megacarioblast*	30 µm Nucleu rotund Cromatina grosolană Citoplasma bazofilă grunjoasă
 2	2. *Megacariocit netrombocitogen*	50—60 µm Nucleu neregulat Citoplasma bazofilă Granulaţii fine azurofile
 3	3. *Megacariocit trombocitogen* (şi nuclei liberi şi trombocite)	80—120 µm Nucleu neregulat Citoplasma cu trombocite
 4	4. *Trombocite* (şi resturi nucleare)	

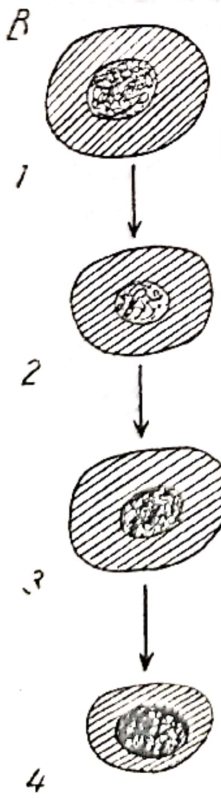
Scanned with OKEN Scanner

Schemă simplificată a celulelor din măduvă, sînge periferic, splină, ganglioni limfatici

A. SERIA MONOCITARĂ

	1. *Monoblast*	25—30 μm Nucleu mare Cromatina fină Citoplasma bazofilă, cu foarte rare vacuole Nu are granulaţii Nucleu > Citoplasmă
	2. *Promonocit*	15—20 μm Nucleu reniform Cromatina fină Nucleol 1 Citoplasma palidă albastru-cenuşie Nu are granulaţii Nucleu = Citoplasma
	3. *Monocit*	12—20 μm Nuclu reniform Cromatina fină Nu are nucleoli Citoplasma cenuşie Granulaţii fine, azurofile Nucleu < Citoplasmă

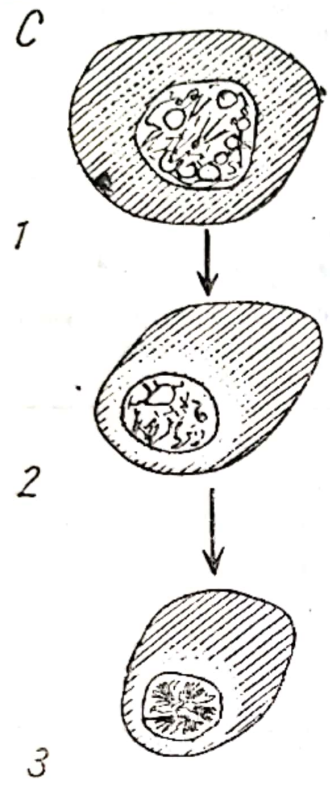
B. SERIA LIMFOCITARĂ

	1. *Limfoblast*	12—15 μm Nucleu sferic, central Cromatina fină Nucleol 1 Citoplasma hialină, bazofilă Nu are granulaţii Nucleu = Citoplasmă
	2. *Prolimfocit*	10—12 μm Nucleu sferic, central Cromatina mai densă Nucleol 1 Citoplasma hialină, bazofilă Nucleu < Citoplasmă
	3. *Limfocit mare*	10—15 μm Nucleu sferic, central Cromatina densă Citoplasma hialină, bazofilă (palidă) Nu are granulaţii sau are rare azurofile Nucleu < Citoplasmă
	4. *Limfocit mic*	6—9 μm Nucleu sferic, picnotic, excentric Citoplasma bazofilă Nu are granulaţii Nucleu < Citoplasmă

Scanned with OKEN Scanner

(continuare tabelul VIII)

C. SERIA PLASMOCITARĂ



1. *Plasmoblast*	20 µm Nucleu rotund, excentric Cromatina fină Nucleoli 2—3 Citoplasma intens bazofilă, cu halou perinuclear Nu are granulaţii Nucleu > Citoplasmă
2. *Proplasmocit*	15—20 µm Nucleu excentric Cromatina densă Nu are nucleoli Citoplasma intens bazofilă, cu halou perinuclear Nu are granulaţii Nucleu = Citoplasmă
3. *Plasmocit*	10—15 µm Nucleu excentric Cromatina în grămezi („roată de car") Nu are nucleoli Citoplasma intens bazofilă, cu halou perinuclear Nu are granulaţii Nucleu < Citoplasmă

2.2.1.0.1.2. Seria trombocitară. Se face o apreciere semicantitativă a lor şi a morfologiei lor, care variază ca dimensiuni de la forme mici la forme gigante. În unele cazuri de sindrom mieloproliferativ, pot să apară în periferie foarte rari nuclei de megakariocite, care se pot evidenţia mai uşor prin îmbogăţire (concentrat leucocitar).

2.2.1.0.1.3. Seria leucocitară (formula leucocitară). Se face mai întîi o apreciere semicantitativă şi apoi una calitativă şi proporţională. Pe un frotiu corect întins, într-un cîmp microscopic cu imersie, se văd în medie (centrul şi periferia frotiului) cîte 2—4 leucocite şi aprox. 10 trombocite izolate sau grupate. Peste 10—20 leucocite în medie pe cîmp indică de obicei o hiperleucocitoză, iar sub 1—4 leucocite la 5—6 cîmpuri indică o leucopenie. Sub 1 trombocit pe cîmp indică, de regulă, o trombocitopenie, iar peste 25—30 o creştere a acestora.

Formula leucocitară. Modificările proporţionale ale diferitelor forme de leucocite din sînge constituie *formula leucocitară,* exprimată la suta de leucocite. Se poate, de asemenea, exprima şi numărul absolut de diferite feluri de leucocite pe mm^3 (tabelul IX). Deoarece limfocitele, polinuclearele şi monocitele, nu se repartizează uniform în frotiu, formula

Scanned with OKEN Scanner

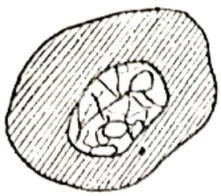
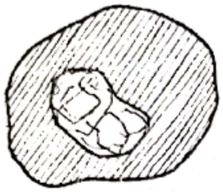
(Continuare tabelul VIII)

D. SERIA RETICULOENDOTELIALĂ (RAR ÎN SÎNGELE PERIFERIC)

D 1	1. *Celulă reticulară limfoidală mare*	10—15 μm Cromatina în rețea laxă Nucleoli 3 Citoplasma albastru deschis Granulații fine azurofile
2	2. *Celulă reticulară limfoidală mică*	9—12 μm Cromatina în rețea laxă Nucleoli 3 Citoplasma albastru deschis Granulații fine azurofile
3	3. *Mastocite* bazofile și eozinofile	
4	4. *Macrofag*	20—30 μm Nucleoli 1—3 Vacuole Granulații azurofile rare
5	5. *Hemocitoblast*	20—30 μm Cromatină fină Nucleoli 1—2 Citoplasma albastră
6	6. *Histoblast*	Nucleu dreptunghiular, perpendicular pe axul mare al celulei

(Continuare tabelul VIII)

E. UNELE CELULE NUCLEATE PATOLOGICE

E  1	1. *Blaşti leucemici*	8—20 μm În leucemii acute Nucleu mare Nucleoli 1—5 Citoplasma bazofilă Uneori corpusculi roşii (Auer)
 2	2. *Monocite atipice*	12—20 μm În mononucleoza infecţioasă Nucleu des reniform, des excentric Citoplasma bazofilă Vacuole (uneori)

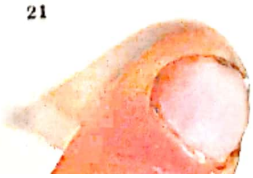
leucocitară se face parcurgînd cîmpul microscopic în zig-zag, cuprinzînd şi marginile şi mijlocul preparatului (figura din tabelul IX).

Se numără cel puţin 100, de preferinţă 200 de elemente nucleate, care vor fi grupate în 7 categorii : polinucleare neutrofile nesegmentate *(N)*; polinucleare neutrofile segmentate *(S)*; polinucleare eozinofile *(E)*; polinucleare bazofile *(B)*; limfocite *(L)*; monocite *(M)* şi, dacă este cazul, celule reticulate *(CR)*. În plus, dacă este cazul, se vor nota separat şi alte celule anormale.

Pentru comoditatea lucrului, se face un tabel cu 7 rînduri (unul pentru fiecare fel de leucocite) şi 10 coloane, în care sînt trecute rînd pe rînd cîte 10 leucocite văzute, repartizate după felul lor.

Valoarea informativă a formulei leucocitare, luată izolat, este deseori relativ mică. Ea este în special utilă, în cazurile în care proporţia de neutrofile este foarte mare (deseori, dar nu întotdeauna, traduce o infecţie bacteriană cu coci grampozitivi sau cu anaerobi) sau foarte mică (hipo- sau agranulocitoză) ; sau dacă se observă o proporţie anormal de mare de eozinofile sau de celule mononucleate, sau dacă se observă celule anormale. Formula leucocitară mai este utilă, pentru a urmări în timp evoluţia unei boli, fie către înrăutăţire, fie către ameliorare, sau pentru a urmări eventuale reacţii adverse ale unei medicaţii.

Sîngele poate prezenta, deseori, modificări cantitative ale leucocitelor, între 3 000 şi 10 000 pe mm^3, care nu pot fi considerate patologice. În schimb, sînt de obicei patologice leucocitozele mari cu neutrofilie, care se întîlnesc deseori, dar nu numai în infecţii cu bacterii grampozitive şi anaerobi ; leucocitoza cu limfocitoză apare în tusea convulsivă, în limfocitoza infecţioasă, în leucemia limfatică ; leucopenia cu neutropenie, pînă la dispariţia neutrofilelor, apare în agranulocitoză ; plasmocitoza apare în rubeolă ; eozinofilia apare în reacţii alergice parazitare, medicamentoase etc.



Scanned with OKEN Scanner

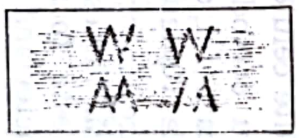
Tabelul IX

Formula leucocitară

	Nou-născut	*Sugar*	*Copil* (6–10 ani)	*Adult*	*Valori extreme* Medie ± 2 D.S*. Celule/mm³	*Valori absolute* Celule/mm³
Număr de leucocite/mm³	15 000–30 000	9 000–15 000	9 000–10 000	7 000–9 000	4 500–10 000	7 000–9 000
Nesegmentate neutrofile	5–10%	1–5%	5%	1–4%	100–2 000	70–450
Segmentate neutrofile	30–70%	30–75%	30–60%	60–70%	1 500–7 000	4 200–6 300
Eozinofile	2–5%	7%	4%	1–4%	30–800	70–360
Bazofile	0–1%	1%	1%	0–1%	0–120	0–90
Limfocite	20–40%	30–70%	25–60%	20–30%	1 500–2 700	1 470–2 700
Monocite	2–8%	6–8%	4–8%	4–8%	240–700	280–720

Medie ± 2 D.S. (deviații standard = 95% din cazuri)

Examinare la microscop



Parcurgerea frotiului

Frotiu de sînge
Mersul explorării: se numără aprox. 50 de celule de fiecare 4 treceri de la periferia frotiului la mijloc și înapoi
În total, se numără 200 de celule (Nu sub 100 de celule!)

Scanned with OKEN Scanner

Modificări calitative sau morfologice ale leucocitelor. Devierea la stînga cu neutrofilie se observă deseori în procese infecţioase cu bacterii grampozitive. Dacă este foarte marcată, este vorba de o reacţie leucemoidă, care se poate produce în pneumonia pneumococică, în pielonefrita acută etc. O deviere la stînga pînă la mieloblaşti, cu un număr mult crescut de leucocite, într-un context clinic corespunzător (afebril, splenomegalie etc.) constituie o informaţie diagnostică importantă pentru o leucemie granulocitară cronică.

O anomalie bizară, dar fără implicare patologică sau semnificaţie diagnostică constă din imposibilitatea neutrofilelor de a se segmenta (anomalia Pilger-Huct).

Dacă la microscop se observă forme neobişnuite sau dacă celulele normale (sau aparent normale) sînt în număr neobişnuit de mare (sau de mic) se vor consulta specialişti sau (şi) tratate de specialitate.

Vom cita *cîteva tablouri patologice:*

Blaştii patologici sînt mesageri ai leucemiei acute. Apariţia de elemente blastice (elemente foarte tinere) pe frotiul de sînge este un semn cert de afectare a organelor hematopoietice.

De o deosebită importanţă diagnostică, sînt blaştii patologici, caracteristici leucemiei acute ; morfologia lor este variabilă şi depinde de linia celulară afectată de procesul leucemic. În leucemia acută a copilului, proliferarea malignă este pe seria limfocitară. În acest caz, se pot confunda uşor limfocitele atipice cu limfocitele normale. În leucemia acută a adultului, leucocitele patologice pot deriva din : mieloblaşti, promielocite, mielomonocite. Ca elemente morfologice comune acestor leucocite maligne amintim : raportul nucleocitoplasmatic, deviat în favoarea nucleului ; nucleul deseori neregulat, cu structura cromatiniană fină ; prezenţă de nucleoli ; citoplasma deseori intens albastră (hiperbazofile). Sînt deci caractere de tinereţe, dar într-o formă atipică.

Recunoaşterea elementelor maligne din seria limfocitară nu este întotdeauna uşoară ; riscul este ca aceste elemente atipice să fie etichetate drept limfocite sau monocite. Din această cauză, examinarea unui frotiu de sînge, provenind de la un bolnav cu febră, splenomegalie cu adenopatie, cu anemie, eventual purpură, trebuie făcută cu multă grijă. Recomandarea este ca examenul frotiului de sînge, pe care se pune sau se bănuieşte diagnosticul de leucemie acută, să fie neapărat completat cu o puncţie sternală. Numai în felul acesta se poate stabili cu precizie un diagnostic sever şi se evită erorile.

În *mononucleoza infecţioasă,* există o limfomonoplasmocitoză specială. Mononucleoza infecţioasă are un tablou hematologic atît de deosebit, încît acestei boli — deşi este o boală infecţioasă — i se acordă un capitol special în tratatele de hematologie. Într-adevăr, morfologia leucocitară este dintre cele mai aparte : se constată o proliferare a tuturor elementelor mononucleate (limfocite, monocite, plasmocite), cu apariţie de numeroase forme de trecere între ele, unele forme tinere atipice, chiar nucleolate, putînd preta la confuzie cu leucemia acută. Mononucleatele atipice din mononucleoza infecţioasă variază între 16 şi 30 μm, cu citoplasmă abundentă, bazofilă, cu nucleu deseori excentric, neregulat rotund şi cu reţeaua de cromatină relativ fină, asemănătoare monocitelor, cu nucleoli sau imagini de falşi nucleoli.

Scanned with OKEN Scanner

Deoarece tabloul clinic al mononucleozei infecțioase și cel al leucemiei acute pot prezenta unele asemănări, trebuie să fim foarte atenți în evaluarea morfologiei leucocitare în aceste cazuri. Ceea ce caracterizează modificările morfologice leucocitare din mononucleoza infecțioasă este polimorfismul elementelor mononucleate, care de cele mai multe ori prezintă o citoplasmă bogată. De ajutor este și faptul că seria roșie și cea trombocitară sînt normale în mononucleoza infecțioasă (cu foarte rare excepții), spre deosebire de leucemia acută, în care modificările leucocitare se însoțesc practic întotdeuna de anemie și de trombocitopenie.

În cazurile dubioase, puncția sternală aduce o informație foarte valoroasă : în mononucleoza infecțioasă, frotiul de măduvă osoasă arată același polimorfism ca în sîngele periferic, spre deosebire de leucemia acută, unde măduva are un aspect monomorf de blaști atipici. De asemenea, pentru diagnosticul de mononucleoză pledează și o analiză serologică, care decelează într-un titru semnificativ prezența anticorpilor eterofili, caracteristici (reacția Paul-Bunnel).

În unele boli virale, se constată deseori în sîngele periferic, iar în meningitele seroase zise și „limfocitare benigne" se constată în L.C.R. celule mononucleate atipice care au o morfologie deosebită, asemănătoare cu limfocitul (dar cu un nucleu mai mare, deseori reniform, cu o cromatină mai laxă, asemănătoare cu aceea a monocitelor). Ele au primit diferite denumiri ca limfomonocitoid, celulă limfocitară monocitoidă, virocit etc. Toate acestea le vom îngloba sub denumirea de mononucleare atipice.

2.2.1.0.1.4. Cercetarea unor agenți patogeni în sînge. Sîngele, în mod normal, *nu* conține agenți patogeni. Chiar și în infecții, stările de bacteriemie sînt relativ rare, paucibacilare și trecătoare. Totuși, în unele boli (malaria, spirochetoza Obermeier, tripanosomiaza, filiarioza), *examenul sîngelui constituie singurul mijloc practic de laborator pentru asigurarea unui diagnostic.* În unele septicemii grave, examenul morfologic al sîngelui permite, uneori, un diagnostic precoce, înainte ca hemocultura să se fi pozitivat. În această categorie, intră în special bacteriemiile și septicemiile cu germeni grampozitivi (stafilococi, pneumococi, streptococi, bacteridie carbonoasă) și, mai rar, cu germeni gramnegativi (neisserii, enterobacterii, pasteurelle, yersinii și altele) (fig. 20).

Unii agenți patogeni se pot vedea numai intraeritrocitari (malaria, babesia), alții sînt alipiți de hematii (uneori malaria și stafilococii) ; alteori, sînt între hematii (spirochetoza Obermeier) și, în fine, uneori sînt în interiorul fagocitelor (bacterii și unii paraziți). În toate aceste cazuri, se folosește în paralel o colorație cu Giemsa, una cu Gram și una cu albastru de metilen.

(Pentru cultivarea agenților patogeni din sînge, vezi 2.2.5.).

Deoarece agenții patogeni, ca și unele elemente anormale din sînge, sînt în general în număr mic, examenul morfologic, în anumite cazuri, trebuie efectuat și prin *metode de concentrare.* Agenții patogeni și elementele citologice în aceste tehnici, deși mai numeroși pe unitatea de volum și pe cîmp microscopic, pot fi însă deformați și greu de recunoscut ; din această cauză, nu trebuie să se renunțe și la examenul frotiului subțire efectuat cu multă răbdare.

Scanned with OKEN Scanner

2.2.1.0.2. Tehnici de concentrare. Pentru punerea în evidență și studiul unor elemente figurate rare (paraziți, bacterii, formațiuni hematologice rare), se poate recurge la executarea și colorarea de picături groase, concentrat leucocitar și la examenul sedimentului de centrifugă al sîngelui hemolizat.

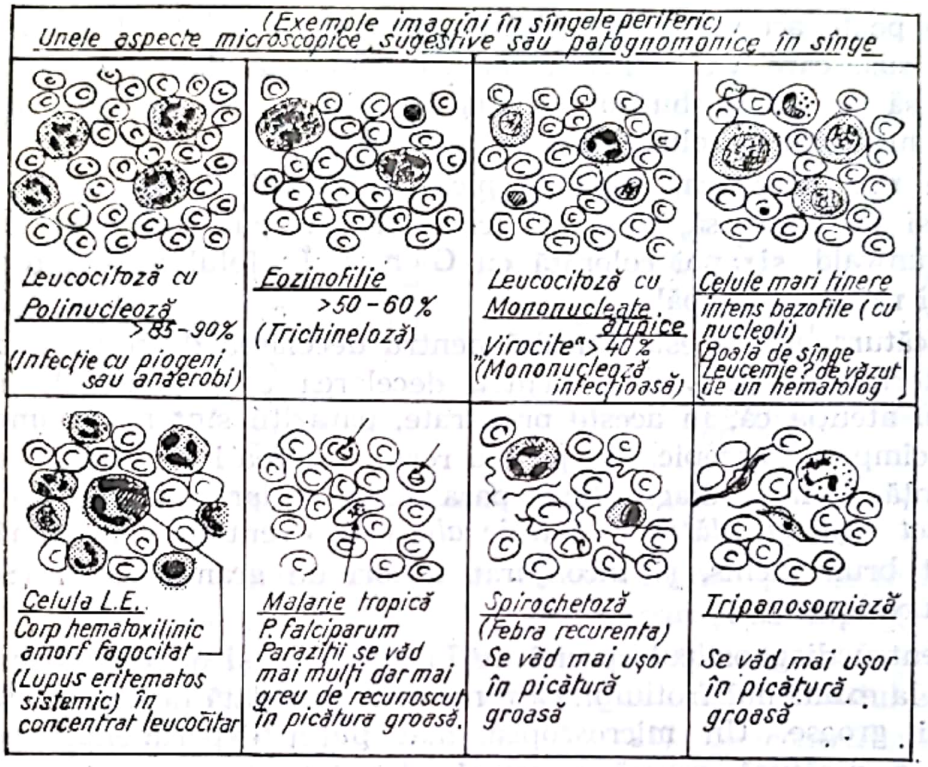


Fig. 20. — Unele aspecte microscopice sugestive sau patognomonice în sîngele periferic.

2.2.1.0.2.1. Picătura groasă. Pe o lamă perfect curată și degresată, se pune o picătură mare de sînge (sau 3 picături mici, apropiate între ele). Cu colțul unei alte lame se amestecă bine, timp de 30—60 secunde, pentru a produce o defibrinare (absolut indispensabilă unui rezultat bun) și pentru a întinde picătura pe o arie de 10—15 mm ∅. Grosimea picăturii este satisfăcătoare, dacă atunci cînd se ține lama vertical, picătura tinde să se prelingă în jos, dar totuși nu curge. Pe aceeași lamă, se pot face 2 sau chiar 3 picături groase (vezi fig. 19). (Unii autori recomandă executarea picăturii groase pe aceeași lamă cu frotiul de sînge, dar deoarece picătura groasă se tratează în alt fel, este mai sigur să fie făcută separat pe altă lamă).

Se lasă să se usuce picătura (pînă nu mai lucește), într-un loc ferit de praf și de muște. După ce s-a uscat bine, dar de dorit nu peste 8—12 ore, se cufundă binișor lama într-un pahar cu apă distilată (sau se acoperă lama cu apă distilată). După ce s-a desăvîrșit hemoliza, se scurge bine apa. Picătura groasă trebuie să apară ca o pată trans-

lucidă palid-alburie. Ea este acoperită, apoi, în continuare, cu o soluție Giemsa (1 picătură la 1 ml apă neutră, tamponată la nevoie la pH 7), și se lasă să se coloreze 30—45 de minute. Se spală cu băgare de seamă (preparatul nefiind fixat se poate detașa, dacă spălarea este prea intempestivă). Se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectiv de imersie.

Se poate acoperi direct picătura groasă cu soluția Giemsa diluată ca mai sus, care va realiza chiar ea hemoliza, dar trebuie ca după aceasta să se scurgă binișor soluția Giemsa cu hemoglobina dizolvată și să se mai adauge soluție Giemsa proaspătă.

Se mai poate ca, după ce picătura groasă a fost hemolizată în în apă și s-a uscat, să fie fixată (ca un frotiu) cu alcool metilic sau cu May-Grünwald, și apoi colorată cu Giemsa. În felul acesta, preparatul este mai rezistent la spălare.

Picătura groasă este folosită pentru decelarea de paraziți, mai rar de bacterii, dar în special pentru decelarea de paraziți ai malariei. Atragem atenția că, în aceste preparate, paraziții sînt mai numeroși pe fiecare cîmp microscopic, dar pentru recunoașterea lor trebuie o anumită experiență. Pentru diagnosticul parazitului malaric, va atrage atenția *un punct roșu și, alăturat, o linie albastră,* eventual o îngrămădire de pigment brun închis, și înconjurat uneori de granule roșii (Schüfner sau Maurer).

Pentru diagnosticul speciei de Plasmodium și de infecții mixte, se recurge la examenul frotiului, care nu va fi niciodată neglijat în favoarea picăturii groase. Un microscopist mai puțin experimentat poate să declare o picătură groasă negativă, dar tot el poate să recunoască parazitul malaric în frotiul subțire.

Tot în picătura groasă, se pot observa diferite bacterii, în cazul unor septicemii grave cu diverși germeni (stafilococi, neisserii, pneumococi, bacteridie carbonoasă etc.), ca și în unele bacteriemii masive, dar trecătoare (în pneumopatii acute, în meningite). În cazurile, în care se suspectează asemenea situații, se vor recolta mai multe lame cu picături groase, pentru a fi colorate cu albastru de metilen și cu coloratia Gram. Uneori, coloratia Giemsa poate constitui o sursă de eroare, dacă soluția de colorant este contaminată cu bacterii, prin folosirea unei sticlării insuficient curățată. Deși evidențierea unor bacterii patogene în sînge (în picătura groasă) este o eventualitate rară, totuși, avînd în vedere ușurința și rapiditatea de execuție, precum și marea valoare informativă pe care o poate aduce, considerăm că această cercetare nu trebuie neglijată. Aceeași observație se referă și la concentratul leucocitar și la sedimentul de centrifugare a sîngelui hemolizat. Aceasta din urmă ar putea avea teoretic cele mai bune șanse de a decela microscopic agenții patogeni, care s-ar afla în sînge.

Scanned with OKEN Scanner

2.2.1.0.2.2. Concentratul leucocitar. Cu o seringă de 10 ml, perfect curată şi sterilă, umectată cu o soluţie de heparină sau în care s-au tras 0,5 ml soluţie sterilă de EDTA 1,5/100, se recoltează din venă sînge, pînă la completarea unui volum de 10 ml. Se răstoarnă încet de cîteva ori seringa, pentru a realiza un bun amestec, apoi seringa este aşezată vertical cu pistonul în jos şi acul în sus, într-un stativ. Se

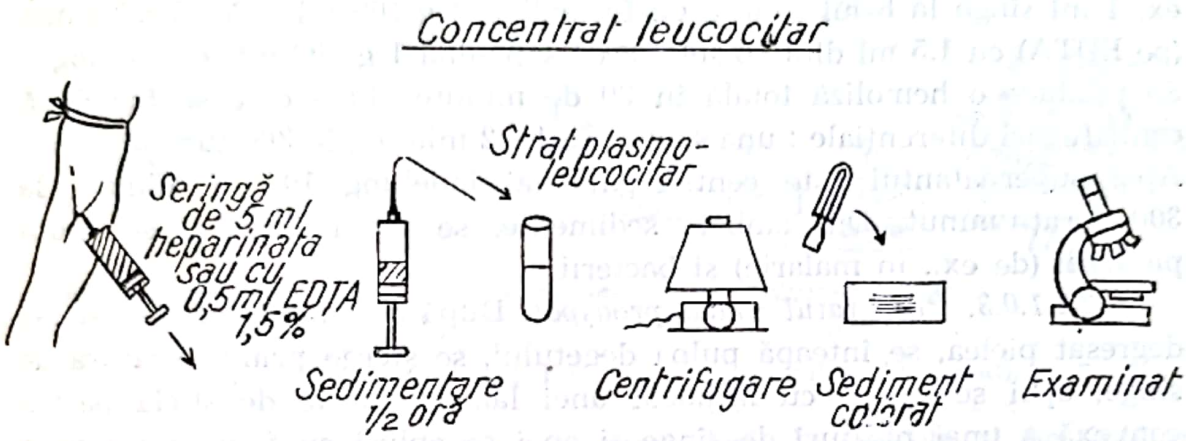


Fig. 21. — Concentratul leucocitar.

aşteaptă sedimentarea eritrocitelor timp de 2—3 ore, apoi se înlocuieşte acul drept al seringii cu un ac îndoit în V inversat şi se împinge binişor pistonul în sus, expulzînd plasma cu leucocitele din ea, pînă se ajunge la partea de sus a masei eritrocitare, avînd grijă ca supernatantul expulzat să fie cules într-un tub de centrifugă (fig. 21). Se centrifughează la 2 000—3 000 turaţii/minut, timp de 10—15 minute. Se scurge supernatantul şi se fac mai multe frotiuri din sedimentul albicios-brun roşcat de la fundul tubului de centrifugare. Un frotiu se fixează cu alcool metilic şi se colorează cu Giemsa (sau cu May-Grünwald-Giemsa), pentru examenul hematologic, alte frotiuri (după fixare), se colorează cu albastru de metilen şi, respectiv, cu Gram, pentru bacterii şi diverşi paraziţi.

La examenul microscopic (mai întîi cu obiectiv uscat × 10 şi × 40, apoi cu imersie), apar un număr foarte mare de elemente nucleate, aceleaşi ca şi pe frotiul subţire, dar în plus pot să apară, chiar la normali, şi celule, care — fiind în număr mic — nu pot fi de obicei decelate pe frotiu (mielociţi, nuclei de megakariociţi, celule reticulare şi celule limfoide). La bolnavii cu afecţiuni hematologice, concentratul limfocitar poate da informaţii preţioase, uneori chiar hotărîtoare în unele forme de anemii (de ex., anemia Biermer), în alte boli de sînge (leucopenii, pancitopenii, leucemii aleucemice, mieloscleroze, metaplazii mieloice, mielom multiplu), în boala Hodgkin. În toate aceste cazuri, cu tablouri morfologice anormale, se vor consulta tratate de specialitate şi se va cere avizul unor hematologi.

Scanned with OKEN Scanner

În privința decelării unor agenți patogeni, ei sînt aceeași, care se pot găsi în picătura groasă, cu diferența că, în malarie, se pot eventual observa gameți de Plasmodium falciparum, dar nu forme tinere care rămîn în eritrocite.

2.2.1.0.2.3. Sedimentul din sîngele hemolizat permite o concentrare mai mare a paraziților. S-au propus diferite tehnici și diluții, ca de ex. 1 ml sînge la 8 ml soluție de formalină 2 g/100 ml apă ; 2 ml sînge (pe EDTA) cu 1,5 ml dintr-o soluție de saponină 1 g/100 ml ser fiziologic. Se produce o hemoliză totală în 30 de minute, după care se fac două centrifugări diferențiale : una scurtă de 1—2 minute, la 300 turații/minut. Apoi supernatantul este centrifugat mai îndelung 10—15 minute, la 300 turații/minut. Din ambele sedimente, se fac frotiuri și se caută paraziții (de ex., în malarie) și bacterii.

2.2.1.0.3. Preparatul umed proaspăt. După ce s-a dezinfectat și s-a degresat pielea, se înțeapă pulpa degetului, se șterge prima picătură de sînge, apoi se atinge cu mijlocul unei lamele curate de sticlă partea convexă a unei picături de sînge și apoi se aplică cu fața în jos pe o lamă de sticlă de asemenea perfect curată. Sîngele se întinde prin capilaritate între cele două suprafețe de sticlă. Picătura de sînge trebuie să fie destul de mică, pentru ca sîngele să nu depășească marginile lamelei. Dacă examenul microscopic nu se poate face imediat, marginile lamelei se umezesc cu puțină vaselină (tehnica mai poate fi folosită și cu colorații vitale). Examenul microscopic se face întotdeauna mai întîi cu o mărire mică, cu obiectiv uscat, apoi cu o mărire mai mare, eventual și cu imersie. Această tehnică nu este superioară picăturii groase, decît prin faptul că este foarte ușoară, rapidă și că permite examinarea de paraziți în mișcare, ca de ex. tripanosoma și microfilariile.

2.2.1.0.4. Fenomenul L.E. Corpusculii și *celulele L.E.* (vezi și *2.2.6.0.5.*). În lupusul eritematos diseminat, mai ales în fazele acute ale bolii, mult mai rar în alte afecțiuni, apar în circulație factori antinucleari, care duc la alterarea unor nuclei de leucocite, cu formarea unor mase amorfe hematoxilinice de culoare roz-violacee la colorația Giemsa, denumite *corpusculii L.E.* În anumite condiții, *in vitro*, corpusculii L.E. sînt fagocitați de polinucleare formînd *celulele L.E.* Fenomenul se petrece *in vitro*, pe celule ușor traumatizate, și evidențierea lui se poate obține prin diferite tehnici și variante. Cel mai simplu și totuși satisfăcător este următorul procedeu :

Se recoltează 10 ml sînge pe perle de sticlă ; se defibrinează prin agitare, timp de cel puțin 10 minute (pînă nu mai sună perlele în timpul agitării). Se realizează astfel o defibrinare, o fragmentare a cheagului și o ușoară traumatizare a elementelor din sînge, necesare producerii fenomenului. Se aspiră sîngele defibrinat într-o seringă, care se așază într-un stativ, cu acul în sus (ca pentru concentratul leucocitar). După

2—3 ore la temperatura camerei (sau la termostat), se produce o sedimentare a eritrocitelor. Se înlocuieşte acul drept cu unul îndoit, se împinge binişor pistonul în sus şi se recoltează într-un tub de centrifugă serul pînă la stratul eritrocitar. Se centrifughează serul şi se fac frotiuri din sediment, care se colorează apoi cu Giemsa (May-Grünwald-Giemsa).

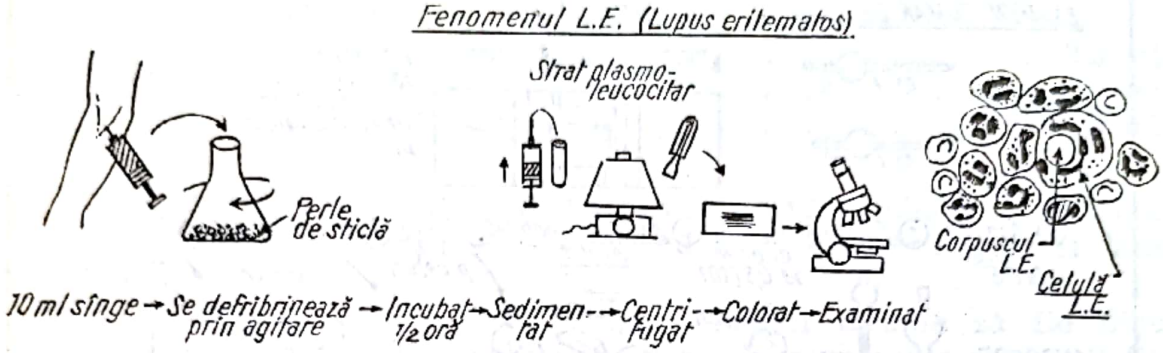


Fig. 22. — Fenomenul L.E. (lupus eritematos diseminat).

Celulele L.E. sînt, de obicei, mai mari decît leucocitele şi prezintă o masă amorfă rotundă (corpuscul hematoxilinic, corpuscul L.E.), înconjurat de o coroană mai mult sau mai puţin completă de nuclei şi de resturi de polinucleare (fig. 22).

2.2.2. NUMĂRĂTORI DE ELEMENTE FIGURATE SANGUINE

Deşi examenul frotiului de sînge poate da unele indicaţii cantitative asupra numărului diverselor elemente sanguine, totuşi, în toate procesele infecţioase este foarte util (sau chiar indispensabil) să se facă o numărătoare de leucocite, nu numai pentru descoperirea unor cifre extreme, sigur patologice, dar mai ales şi pentru a avea o cifră de plecare, în cadrul unei boli care poate evolua în timp. Celelalte numărători (eritrocite, trombocite, reticulocite, eozinofile) pot deseori fi neglijate şi nu se vor cerceta decît în anumite contexte clinice sau cînd frotiul de sînge arată un tablou patologic.

2.2.2.0.1. Materiale necesare. Numărătorile se bazează toate pe acelaşi principiu, utilizînd : pipete amestecătoare, o cameră de numărat, soluţii pentru diluţie.

2.2.2.0.1.1. Pipetele amestecătoare (Potain) realizează, în acelaşi instrument, o prelevare a unei cantităţi fixe de sînge, apoi diluarea şi amestecarea sîngelui cu un volum fix de diluant. Pipetele Potain sînt de 2 feluri : una mică, cu care se fac diluţii 1/10—1/20 (pentru leucocite), şi una mai mare, cu care se fac diluţii 1/100—1/200 (pentru eritrocite). Pipetele sînt prevăzute la capătul proximal cu un tub de cauciuc, care

are la capătul lui un muștiuc de sticlă (flambabil), cu dop de vată, ca la pipetele Pasteur (fig. 23).

2.2.2.0.1.2. Camera (celula) de numărat are un volum fix și un cadrilaj pentru ușurarea numărătorii. Camera trebuie să fie perfect curată, uscată și corect montată, cu o lamelă șlefuită bine adaptată. Sînt

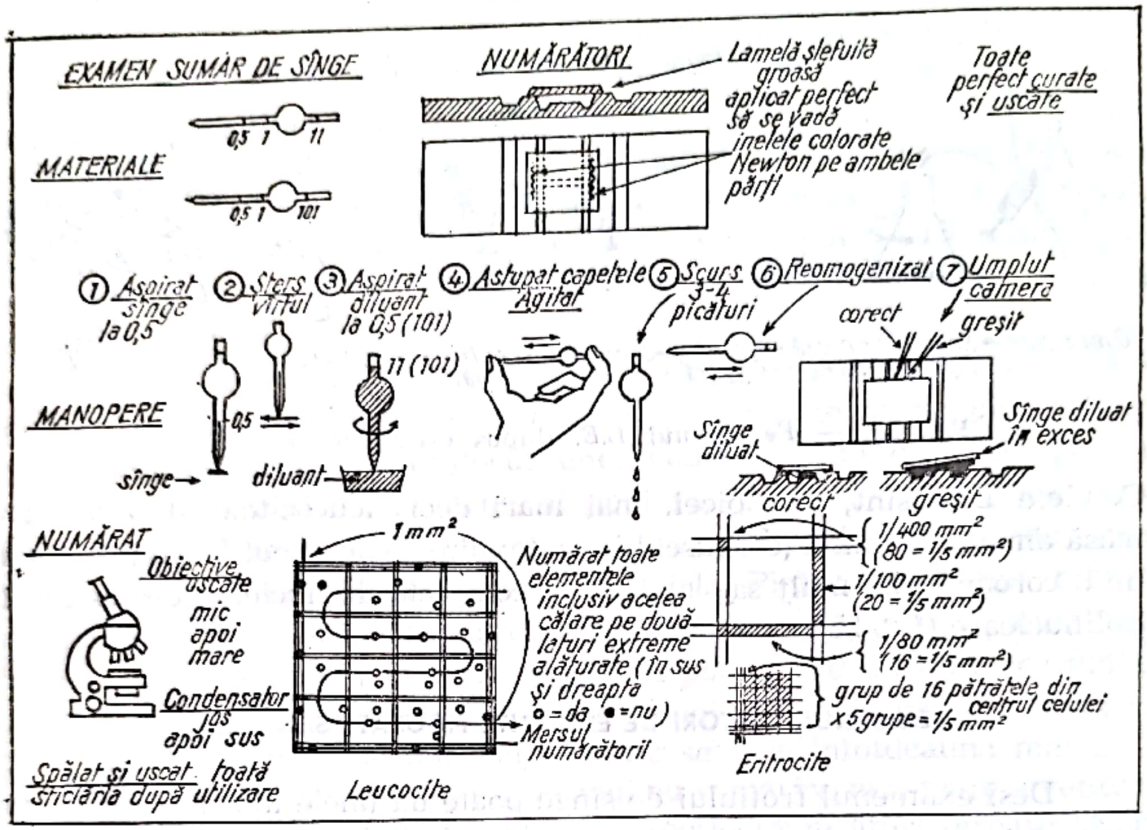


Fig. 23. — Examenul sumar de sînge. Numărători.

2 feluri de camere de numărat : pentru numărătoarea elementelor din sînge (leucocite, eritrocite, trombocite) se folosește camera tip Bürker-Türck * ; pentru numărătoarea elementelor din L.C.R., ca și pentru numărătoarea de eozinofile, se folosește camera tip Fuchs-Rosenthal (vezi *2.4.0.0.5.3.*).

2.2.2.0.1.3. Soluțiile pentru diluție sînt diferite, în funcție de elementele care trebuie numărate și anume :

Soluția pentru leucocite

Acid acetic glacial	1 ml
Apă distilată	100 ml
(Albastru de metilen 1%, o picătură, pentru a recunoaște mai ușor soluția respectivă)	

* Sînt mai multe tipuri de camere de numărat ; toate au gravat înălțimea camerei (0,10 mm), suprafața unui pătrat mare (de ex., 1/16 mm²) și a unui pătrat mic (1/400 mm²).

Soluţia pentru eritrocite
- Soluţie clorurosodică izotonă (0,85%) . . . 100 ml
- (eozină sol. 1%, o picătură pentru a recunoaşte mai uşor soluţia respectivă)

Soluţia pentru trombocite
- Oxalat de amoniu . . . . . 1 g
- Na_2EDTA . . . . . 0,010 g
- Apă distilată . . . . . 100 ml

Soluţia pentru eozinofile
- Eozină soluţie apoasă 1% . . . . . 2,5 ml
- Acetonă . . . . . 2,5 ml
- Apă distilată . . . . . 45,0 ml

Soluţiile se păstrează la frigider şi sînt utilizabile 2 săptămîni. Se filtrează, înainte de utilizare, dacă nu sînt perfect limpezi şi fără sediment.

2.2.2.0.2. Mersul operaţiilor. Pipeta Potain trebuie să fie bine uscată, cu perla interioară mobilă. Camera de numărat trebuie să fie perfect curată şi uscată, iar lamela şlefuită de asemenea trebuie să fie perfect curată. Lamela va fi uşor aburită, suflînd pe ea cu gura deschisă, apoi va fi aplicată şi apăsată pe locaşul ei pe cameră, în aşa fel încît să apară pe ambele părţi inelele colorate (curcubeele) ale lui Newton, care indică o perfectă aderenţă.

După ce pielea a fost curăţată, degresată şi dezinfectată cu eter, se înţeapă ferm cu un ac gros steril (sau cu o lanţetă de unică utilizare), pentru a obţine spontan o picătură de sînge, care se şterge cu o bucată de vată curată. Din a doua picătură de sînge, se recoltează pentru numărători (şi frotiuri).

2.2.2.0.2.1. Numărătoarea de leucocite. Se aspiră sînge cu pipeta respectivă pînă la semnul 0,5 (sau uşor peste), se şterge vîrful pipetei cu o bucată de hîrtie de filtru şi se aduce coloana de sînge exact la 0,5. Dacă se lucrează cu sînge recoltat pe EDTA, sticluţa cu sînge trebuie în prealabil bine agitată, pentru a obţine o omogenizare perfectă a elementelor. Neamestecul corect de sînge cu EDTA la prelevare şi neamestecul corect la laborator, înainte de numărătoare (şi de executarea frotiurilor subţiri), pot fi două surse însemnate de eroare. În continuare, se aspiră lichidul de diluţie pentru leucocite, amestecînd uşor prin mişcări de rotaţie în jurul axei pipetei, pentru ca să nu rămînă bule de aer în camera de amestec sau să nu treacă sînge nediluat pînă în partea capilară a pipetei peste camera de numărat. Se aspiră lichidul de diluţie pînă la semnul 11. Se scoate vîrful pipetei din lichidul de diluţie şi se astupă mai întîi capătul distal, apoi cel proximal al pipetei între police şi index şi se agită bine timp de 1—2 minute (vezi fig. 23), apoi se scurg 3—4 picături şi se lasă pipeta să stea în poziţie orizontală pînă în momentul numărătorii.

Dacă pipeta astfel încărcată trebuie transportată de la bolnav la laborator, se ţine pipeta în mînă cu capetele închise sau se astupă un capăt îndoind şi înodînd celălalt capăt al pipetei cu ajutorul tubului de cauciuc sau se descarcă pipeta într-un tub de hemoliză, care apoi se

astupă etanș cu un dop de cauciuc. În momentul numărătorii, se omogenizează bine sîngele diluat prin agitare.

Se controlează pregătirea corectă a camerei de numărat, care trebuie să fie perfect curată și uscată și cu lamela șlefuită originală perfect aplicată, în așa fel ca să apară inelele colorate (curcubee) ale lui Newton pe ambele laturi. Ca lamela să adere, ea poate fi aburită ușor cu gura, imediat înainte de aplicare, și apoi printr-o apăsare ușoară este aplicată pe camera de numărat. În lipsa lamelei originale, se poate folosi o jumătate de lamă șlefuită, care este mai solidă și care expune la mai puține erori, decît o lamelă subțire obișnuită.

Se umple camera de numărat cu diluția respectivă, fără exces și fără bule de aer, verificînd buna adeziune a lamelei pe cameră. Se așteaptă 1—2 minute, pentru sedimentarea leucocitelor (și dacă este cazul a eritrocitelor) și 15 minute pentru trombocite. Se controlează la microscop cu ocular $\times 7$ și obiectiv $\times 10$ răspîndirea uniformă a elementelor, după care (cu obiectivul $\times 10$, eventual și cu $\times 40$) se numără toate leucocitele aflate în ariile respective (vezi mai jos), inclusiv cele aflate călare pe 2 laturi alăturate (de ex., sus și la dreapta) și nu acelea călare pe celelalte 2 laturi (de ex., la stînga și jos).

Pentru leucocite, se numără celulele aflate pe 4 mm^2, și anume cîte 1 mm în fiecare colț al cadrilajului, care este împărțit prin linii duble în 16 pătrate și mărginit de linii triple. Se numără atît leucocitele din pătratele mari, cît și cele dintre liniile duble (vezi fig. 23). Se face media pentru 1 mm^2, care se înmulțește cu 200 ($\times 20 =$ diluția 0,5/10 ; $\times 10$, înălțimea camerei fiind de 0,1 mm), pentru a afla numărul de leucocite pe mm^3. Normal, sînt 3 000—9 000 leucocite/mm^3. Imediat după terminarea numărătorii, se spală cu grijă pipeta și camera de numărat cu apă de robinet, apoi cu apă distilată. Pipeta se usucă la cuptor. Dacă ne grăbim, spălăm cu apă distilată, apoi cu alcool, cu eter și uscăm aspirînd cu gura (nu suflînd). Camera se șterge bine cu o cîrpă curată și se păstrează la adăpost de praf.

2.2.2.0.2.2. Numărătoarea de eritrocite este inutilă, dacă cantitatea de hemoglobină și cifra hematocritului cad în limite normale, sau dacă aspectul frotiului nu arată vreo anomalie.

Numărătoarea de eritrocite se face cu aceleași operații ca pentru leucocite, cu deosebirea că se utilizează o pipetă amestecătoare Potain, cu gradațiile 0,5 ; 1 și 101. Se aspiră sînge pînă la 0,5 și lichid de diluție pentru eritrocite (vezi mai sus). Se procedează ca mai sus. Se numără eritrocitele în aceleași condiții, ca mai sus, dar în pătrățele mici din mijlocul camerei de numărat.

Toate eritrocitele aflate în 5 pătrate mici, fiecare cu 16 subdiviziuni din mijlocul camerei sau din 20 dreptunghiuri, formate de liniile duble (vezi fig. 23), reprezintă 1/5 mm^2 și numărul lor înmulțit cu 10 000 reprezintă numărul de eritrocite pe mm^3 (vezi fig. 23). Numărul de eritrocite normal pe mm^3 este 4 700 000 $\pm$ 500 000, la bărbat, și 4 200 000 $\pm$ 500 000, la femeie.

Scanned with OKEN Scanner

2.2.2.0.2.3. Numărătoarea de trombocite decurge asemănător ca pentru leucocite, cu pipeta pentru leucocite, dar se aspiră pînă la 1 şi se umple în continuare pipeta cu soluţia pentru trombocite (vezi *2.2 2.0.1.3.*) pînă la 11. Se umple camera de numărat, se aşteaptă 15 minute pentru sedimentarea trombocitelor, iar rezultatul, şi anume media pe un mm^2, se înmulţeşte cu 100 (× 10 diluţia şi × 10 înălţimea camerei de numărat). Numărul normal de trombocite este 150 000—300 000/mm^3.

2.2.2.0.2.4. Numărătoarea de eozinofile este foarte rar necesară. Se recoltează sînge cu pipeta pentru leucocite pînă la marca 1 şi lichid de diluţie pentru eozinofile pînă la 11 şi se numără în camera Fuchs-Rosenthal (utilizată de obicei pentru L.C.R.; vezi *2.4.0.0.5.3.*). Se numără eozinofilele pe 15 pătrate mari. Numărul găsit împărţit la 3 şi înmulţit cu 10 arată numărul eozinofilelor pe mm^3.

Insistăm ca imediat după executarea oricărui fel de numărătoare, cum s-a mai spus, să se facă golirea, spălarea minuţioasă cu apă de robinet şi apoi în mod repetat cu apă *distilată* şi uscarea pipetelor şi a camerei de numărat. Pentru grăbirea uscării, pipetele pot fi puse la termostat sau clătite cu alcool, apoi cu eter şi uscate prin aspiraţie la trompa de apă sau cu gura, dar *nu prin suflare !*

Numărătorile sînt expuse la numeroase *surse de eroare :* sîngele neamestecat bine, bulă de aer în pipetă, pipeta nu este uscată, vîrful pipetei ciobit sau nu este şters bine de sînge, aspiraţie incorectă a volumelor indicate. Toate acestea pot da, fiecare în parte, erori de 5—10 şi chiar 30% ! Dacă se utilizează la camera de numărat lamele neşlefuite sau dacă nu s-a făcut o bună aderare între lamelă şi cameră, eroarea poate fi cuprinsă între 20 şi chiar 100%. Eroarea statistică este de ordinul ± 20%, pentru leucocite, şi ± 30%, pentru eritrocite.

2.2.2.0.2.5. Numărătoarea de reticulocite nu se face în camera de numărat. Pe o lamă portobiect perfect curată, se pune alăturat o picătură de sînge şi una din soluţia de brillantcresylblau (brillantcresylblau 1 g, Na citric 0,4 g, NaCl 0,85 g, apă distilată 100 ml). Se amestecă, se aşteaptă 5 minute, apoi se face un frotiu subţire şi se examinează cu imersia la microscop. Eritrocitele adulte apar colorate albastru-verzui palid, iar reticulocitele cu o reţea granulo-filamentoasă de culoare albastru-închisă. Se pune în ocularul microscopului o bucată de hîrtie în care s-a decupat o mică fereastră de cca. 2—3 mm latură, pentru a micşora cîmpul microscopic, uşurîndu-se astfel citirea. Se numără reticulocitele la 500 de eritrocite şi se exprimă rezultatul în reticulocite la 1 000 eritrocite (normal 5—15/1 000 de eritrocite).

2.2.3. CERCETĂRI DIVERSE ÎN SÎNGE

2.2.3.0.0.1. Dozarea de hemoglobină este cuprinsă în una dintre cercetările hematologice obişnuite. Pentru dozări precise şi lucru în masă, cum se lucrează într-un laborator central, se foloseşte tehnica colorimetrică, cu transformarea hemoglobinei în cianmethemoglobină. Pentru

Scanned with OKEN Scanner

obținerea mai rapidă și de obicei suficient de precisă a unui rezultat orientativ, se folosește metoda Sahli (fig. 24).

Se pune în tubul gradat acid clorhidric N/10 pînă la marca 10. Se adaugă cu pipeta specială 0,02 ml sînge nativ sau sînge pe EDTA, se amestecă și se așteaptă 3—5 minute, pentru transformarea hemoglobinei

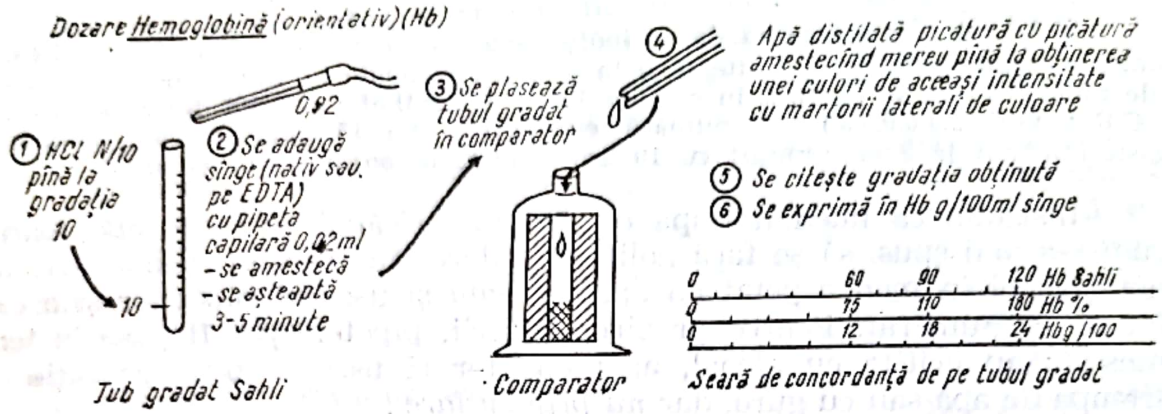


Fig. 24. — Dozare de hemoglobină (orientativ).

roșii în hematină brună. Se introduce tubul în comparator și se adaugă treptat, picătură cu picătură și amestecînd mereu, apă distilată pînă ce culoarea este aceeași cu a celor două etaloane de culoare învecinate. Se citește rezultatul exprimat în grame de hemoglobină la 100 ml sînge (și nu în procente).

2.2.3.0.0.2. Hematocritul (determinarea volumului pachetului eritrocitar, față de volumul sîngelui integral luat ca 100). Se umple, cu ajutorul unei pipete Pasteur efilate sau cu o seringă cu ac lung, un tub de hematocrit cu sînge recoltat pe EDTA pînă la marca 100 (sau pe o coloană de 10 cm înălțime). Se centrifughează puternic la cel puțin

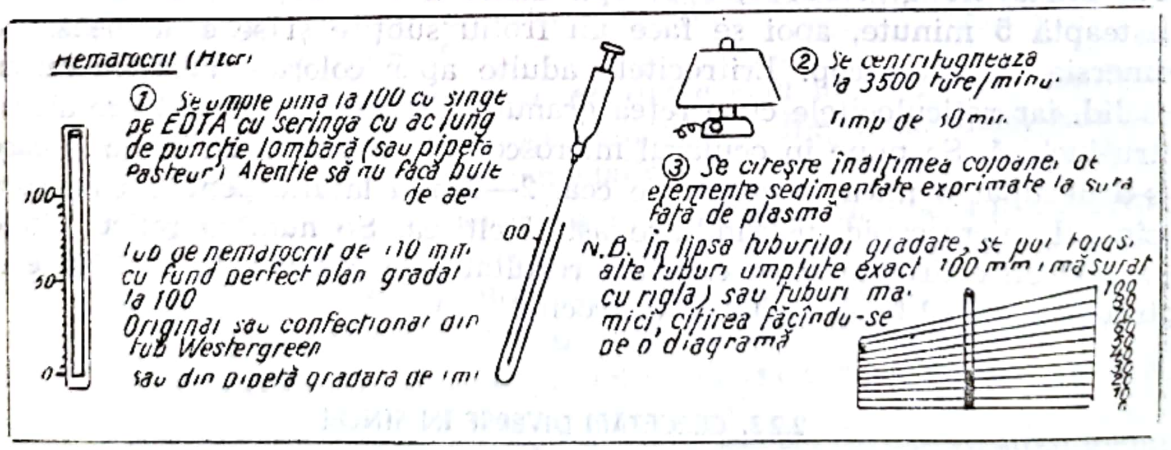


Fig. 25. — Hematocrit.

3 000—3 500 turații/minut, timp de 30 de minute (fig. 25). Se măsoară cu o riglă înălțimea pachetului eritrocitar și aceea inițială a sîngelui integral. Rezultatul se exprimă procentual.

Dacă nu se dispune de un tub original pentru hematocrit, se poate improviza unul din pipeta Westergreen sau din pipeta gradată de 1 ml. Dacă coloana inițială de sînge este mai mică de 100 gradații sau 100 mm, se poate folosi o diagramă cu ajutorul căreia să se citească procentul masei eritrocitare față de sîngele integral.

Cunoscîndu-se numărul de eritrocite pe mm^3, hemoglobina și hematocritul, se pot afla unele valori eritrocitare și anume :

Volumul eritrocitar mediu (V.E.M.) este egal cu hematocritul înmulțit cu 100 și împărțit la cifra milioanelor și a sutelor de mii (de obicei primele 2 cifre) a numărului de eritrocite (normal = 95 $mm^3 \pm 5$). *Concentrația de hemoglobină medie* (CHEM) este egală cu hemoglobina (grame la 100 ml sînge) înmulțit cu 100 și împărțit la cifra hematocritului (normal = 34/100 ± 2).

2.2.3.0.0.3. Viteza de sedimentare a eritrocitelor (V.S.E.). Într-o seringă de 2 (sau de 5 ml), care etanșeizează bine, perfect curată și uscată, se trage în prealabil 0,4 (respectiv 1) ml dintr-o soluție izotonică (3,8/100) de citrat trisodic. Se punctionează vena și se trage în continuare 1,6 (respectiv 4) ml sînge. Se mai poate proceda și altfel : într-un tub 10/100, perfect curat și uscat, se pune exact 0,4 ml dintr-o soluție de citrat trisodic 3,8/100, peste care se adaugă 1,6 ml sînge, fie lăsînd să curgă prin acul băgat în venă, sînge pînă la o marcă trasată anterior cu grijă, fie măsurînd repede cu pipeta, înainte de a se coagula, din sîngele recoltat într-un tub steril, recoltat și pentru alte scopuri. Se amestecă sîngele cu soluția de citrat, evitînd formarea de spumă și se aspiră apoi amestecul într-o pipetă Westergreen curată, uscată și cu un dop de vată la extremitatea negradată (ca la o pipetă gradată obișnuită), pînă la marca zero. Pipeta astfel încărcată se plasează perfect vertical într-un stativ special, avînd grijă ca extremitatea de jos să fie aplicată perfect etanș pe suportul ei de cauciuc (fig. 26).

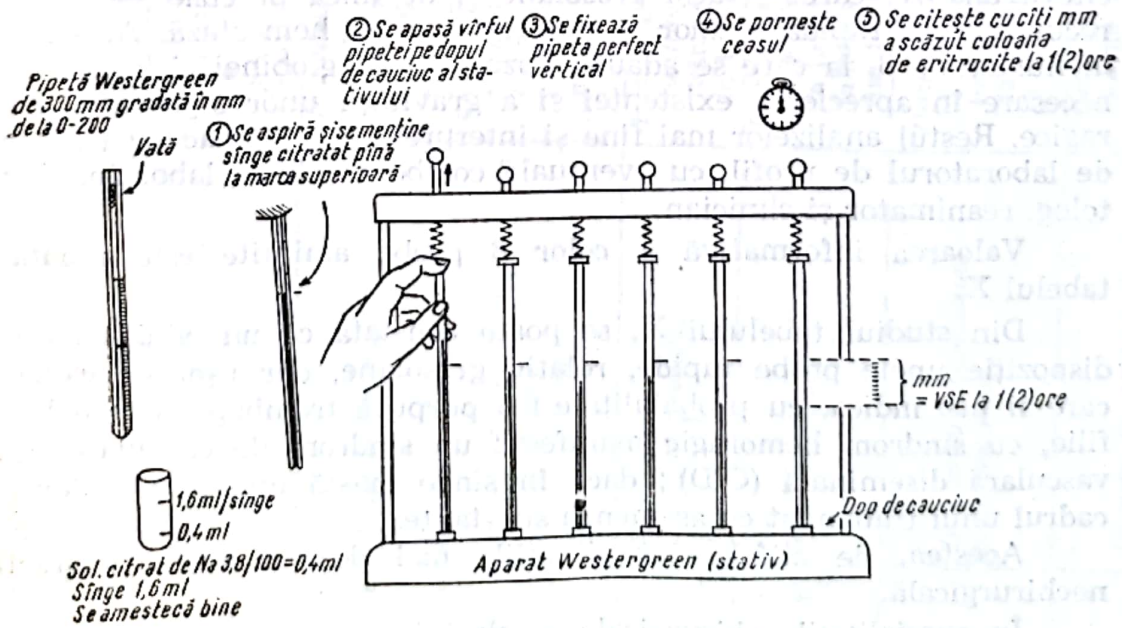


Fig. 26. — Viteza de sedimentare a eritrocitelor.

După 1 oră (majoritatea autorilor consideră inutilă citirea și la 2 ore), se citește numărul de milimetri cu care a coborît coloana de eritrocite.

Pentru umpierea pipetei, s-au imaginat o serie de dispozitive mai mult sau mai puțin ingenioase, dar nu indispensabile.

Valorile normale, după 1 oră, sînt : la nou-născut 1—2 mm ; la copil 7—11 mm, la adult (bărbat) 3—8 mm și la femeie 6—11 mm. Valori normale sau chiar încetinite se constată în hepatitele virale, valori crescute în infecții bacteriene și în leptospiroză, valori mult crescute în reumatismul articular acut în fazele evolutive și foarte mult crescut în puseurile acute de boli de colagen și de lupus eritematos diseminat.

2.2.4. EXPLORAREA SUMARĂ A HEMOSTAZEI

Prin hemostază, se înțelege totalitatea fenomenelor complexe și interdependente, care intervin în echilibrul coagulolitic al sîngelui. În hemostază, intervin 3 grupe de factori : vasculari, trombocitari și cel puțin o duzină de factori plasmatici. Toți acești factori pot fi studiați în laboratorul de profil, dar — deși tehnicile par simple în principiu — ele nu pot fi executate corect, decît cu asigurarea unei aparaturi și sticlării perfect curate și de bună calitate, ca *garanția purității și standardizării ingredientelor* (ceea ce nu este practic posibil deocamdată în majoritatea laboratoarelor noastre) și cu *asigurarea* execuției cu *mare precizie și acuratețe* a diferitelor tehnici.

Din aceste motive, explorarea completă a hemostazei nu poate fi cerută clinicianului, ocupat cu îngrijirea bolnavului său. Clinicianul însă poate face, fără nici o aparatură specială și într-un minimum de timp, cîteva analize, care — deși grosolane și de mică precizie — îi permit recunoașterea rapidă a unor tulburări grave de hemostază. Acestea sînt în număr de 8, la care se adaugă dozarea hemoglobinei și hematocritul, necesare în aprecierea existenței și a gravității unor sindroame hemoragice. Restul analizelor mai fine și interpretarea lor exactă va fi făcută de laboratorul de profil, cu eventuala colaborare între laborator, hematolog, reanimator și clinician.

Valoarea informativă a celor 8 probe amintite este redată în tabelul X.

Din studiul tabelului X, se poate constata că un clinician are la dispoziție unele probe rapide, relativ grosolane, dar ușor de executat, care îi pot indica, cu probabilitate : o purpură trombopenică ; o hemofilie, cu sindrom hemoragic manifest ; un sindrom de coagulare intravasculară diseminată (CID) ; dacă în sînge există un anticoagulant, în cadrul unui tratament cu asemenea substanțe.

Acestea, de altfel, sînt situațiile mai des întîlnite în practica nechirurgicală.

În specialitățile chirurgicale, explorările pre- și postoperatorii ale hemostazei trebuie să fie mai complete, pentru a depista și tulburările

Analize minimale (uşor de executat şi fără reactanţi biologici) pentru explorarea hemostazei (tabel rezumativ) Tabelul X

	Analiza	Ce explorează, cum se determină	Valori normale	Modificări patologice
1	*Nr. de trombocite*	Nr. de trombocite prin numărătoare în cameră	150 000 — 300 000	Trombocitopenie în : — *Purpura trombocitopenică* — *Sindromul C.I.D.*
2	*Test de fragilitate capilară* (Rumpel — Leede)	*Funcţia hemostatică a vaselor şi a trombocitelor (hemostaza primară)* Apariţie de peteşii la 5, minute sub aplicarea unui garou cu o presiune cu 10 mm Hg peste tensiunea arterială minimă	Peteşii absente	Apar peteşii în : — *Purpura trombocitopenică* (alergia ±) — Boala Willebrand (deficit vascular sau trombocitar) *Normal în hemofilie*
3	*Timp de sîngerare* (Duke)	*Hemostaza primară* Timpul de sîngerare a unei plăgi înţepate de 3 mm lăţime şi 3 mm adîncime la lobulul urechii	1,5 — 4 minute	Alungit în : — Trombopenii şi deficienţe trombocitare — Boala Willebrand *Normal în hemofilie*
4	*Timp de coagulare în tub* (Lee-White)	*Coagulabilitatea globală* a sistemului endogen plasmatic Coagularea sîngelui în tub ţinut la 37° (eventual în mînă)	4 — 8 minute	Prelungit în : — Hemofilii — Hipofibrinogenemii — *Prezenţa de anticoagulant circulant* — *Sindrom C.I.D.*
5	*Retracţia cheagului*	*Funcţia trombodinamică a trombocitelor* Retracţia cheagului sîngelui în tub ţinut la 37°	Completă după 3 ore	Alungit în trombopenii
6	*Liza cheagului la 37°*	*Fibrinoliza* Liza cheagului din sînge în tub, ţinut la 37° (eventual în mînă) cîteva minute pentru liza foarte accelerată	Absentă după 24 ore În cazuri patologice poate apărea în puţine minute	Accelerată în : — *Hiperfibrinoliză* — *Sindromul C.I.D.*
7	*Determinarea* (grosolană) *a fibrinogenului*	*Determinarea grosolană globală a fibrinogenului* Precipitarea fibrinogenului din plasma oxalatată, ţinută la 56°	Coagulare în 2 — 3 minute	Întîrziată sau absentă în : — Sindromul C.I.D. — Hipo- şi afibrinogenemii
8	*Decelare de produşi de degradare a fibrinogenului prin etanol-gelificare*	*Fibrinoliza patologică* Studiul apariţiei în 10 minute a unui gel, într-un amestec de plasmă oxalatată cu etanol (sol. 50/100)	Nu se produce nimic Patologic, apare un gel după 10 min.	Gelificare în sindromul C.I.D.

Scanned with OKEN Scanner

latente, care se pot declanșa și manifesta în timpul actului chirurgical sau în perioada postoperatorie.

Redăm mai jos modul de execuție al acestor 8 probe elementare.

2.2.4.0.0.1. Numărătoarea de trombocite se face în camera de numărat. Normal, sînt 150 000—300 000 trombocite/mm^3 Sub 50 000/mm^3, se consideră o trombocitopenie severă. Ea trebuie verificată pe frotiul de sînge și, în caz de neconcordanță, se repetă numărătoarea (vezi și *2.2.2.0.2.3.*).

2.2.4.0.0.2. Testul de fragilitate capilară (Rumpel-Leede). Se aplică pe brațul pacientului un garou (eventual, manșeta unui aparat de tensiune) și se menține timp de 5 minute o presiune cu aprox. 10 mm Hg mai mare ca presiunea diastolică. În mod normal, nu apar peteșii. În funcție de numărul lor, se înseamnă cu +, ++, +++ (slab, pozitiv și intens pozitiv).

2.2.4.0.0.3. Timpul de sîngerare (T.S.). După dezinfecție, se înțeapă lobulul urechii, sprijinit pe un dop de cauciuc (de la o sticluță de penicilină), cu o lansetă sau un ac gros steril, pentru a avea o înțepătură de aprox. 3 mm lățime și 3—4 mm adîncime. Se pornește cronometrul și din 15 în 15 secunde se aplică (fără a apăsa) o fîșie de sugativă pe locul înțepat. Se oprește cronometrul, cînd hîrtia nu mai este pătată și se citește timpul scurs de la executarea punctiei. Normal = 1,5—4 minute.

2.2.4.0.0.4. Timpul de coagulare în tub (T.C.) (Lee-White). Prin punctie venoasă, se extrag 2—3 ml sînge, care se culege într-un tub perfect curat de 12/120 mm și se pune în baie de apă la 37° sau se ține la cald în mîna închisă. Se pornește imediat cronometrul. Din minut în minut, se înclină ușor tubul, pentru a urmări coagularea. Cronometrul se oprește, cînd sîngele nu mai curge la răsturnarea completă a tubului. Normal = 4—8 minute.

2.2.4.0.0.5. Retracția cheagului. După ce s-a produs coagularea, se plasează tubul cu sînge la termostat la 37°. În mod normal, după 3 ore, cantitatea de ser eliberat trebuie să reprezinte 30—50/100 din volumul total al sîngelui.

2.2.4.0.0.6. Liza cheagului la 37°. Sîngele închegat, păstrat în continuare la 37°, nu se lizează în mod normal pînă a doua zi. În fibrinoliza accelerată, în sindromul de coagulare intravasculară diseminată, cu hemoragie acută, liza cheagului se poate produce chiar în cîteva minute.

N.B. Probele T.C. retracția și liza cheagului se fac toate în același tub, pe aceeași probă de sînge.

2.2.4.0.0.7. Determinarea grosolană a fibrinogenului. Se pune aprox. 1 ml plasmă oxalatată * într-un tub de hemoliză (10/100) și se ține 2—3 minute în baie de apă la 56°C. În mod normal, plasma coagulează, iar în lipsa fibrinogenului plasma rămîne limpede.

Determinarea unor produși de degradare a fibrinogenului se face ca și în sindromul de coagulare intravasculară diseminată, prin testul de etanol gelificare. Se pune într-un tub de hemoliză (10/100) 0,5 ml plasmă

* Plasma oxalatată se obține prin recoltarea sîngelui pe amestec de oxalați Wintrobe uscat (vezi *Anexa 2*).

oxalatată, o picătură de NaOH N/10 și 0,15 ml etanol 50/100 *. Se amestecă prin răsturnare și apoi se așteaptă 10 minute. Se înclină tubul cu băgare de seamă, pentru a observa dacă se produce un gel, care să indice prezența de produși de degradare a fibrinogenului.

2.2.5. HEMOCULTURA

Obiective. Hemocultura urmărește să cultive bacteriile aflate în sînge, evitînd contaminările incidentale ale mediului de cultură, în cursul diferitelor manopere. Pentru interpretarea corectă a hemoculturilor, trebuie deosebiți contaminanții incidentali de germenii patogeni.

Hemocultura trebuie executată cu materiale și în condiții deosebite de către un personal bine calificat. Avînd în vedere importanța acestei analize, pentru diagnosticul etiologic al multor infecții severe, vom insista asupra ei.

În cursul diferitelor infecții (septicemii, bacteriemii etc.), se pot găsi în sînge, în mod intermitent, mai rar continuu, o serie de germeni. O mică parte din acești germeni sînt în plin potențial de multiplicare ; o altă parte, însă, sînt fie în stare de latență, fie în parte lezați de condițiile neprielnice de dezvoltare, datorate complexului de factori care se încadrează în noțiunea de putere antimicrobiană a sîngelui, fie din cauza unui eventual contact cu substanțe antimicrobiene exogene. Unii germeni sînt liberi în torentul sanguin, alții aderă la hematii, alții sînt încorporați (dar nu neapărat omorîți) în fagocite sau prinși în mici cheaguri de fibrină.

Numărul germenilor viabili din sînge este în general mic (cîțiva pe ml), uneori foarte mic, și mai rar foarte mare (poate o sută sau o mie pe ml). Deși în sînge se pot găsi multe feluri de germeni (bacterii, micoplasme, chlamidii, rickettsii, fungi, paraziți, virusuri), hemoculturile nu pun în evidență decît bacterii și, eventual, fungii.

În sînge, se pot găsi o mare varietate de bacterii „patogene" sau „condiționat patogene", sau chiar care trec prin sînge (bacteriemii trecătoare), fără a pricinui nici o tulburare. Fiecare dintre acești germeni pot avea nevoile lor de dezvoltare (anumiți factori de creștere și lipsa unor substanțe inhibante, pH, atmosferă aerobă cu CO_2, săracă în oxigen și cu CO_2, anaerobioză strictă). În unele cazuri, infecțiile sînt mixte (diverși aerobi, aerobi și anaerobi, sau diverși anaerobi).

Hemoculturile se pot contamina sau suprainfecta în momentul recoltării și al manipulărilor ulterioare ; din această cauză, sînt necesare precauții riguroase și recurgerea la *„sisteme închise"* de recoltare și de transplant, unele comercializate, altele improvizate.

Sîngele pentru hemoculturi se recoltează de preferință pe un anticoagulant, care scade în același timp și puterea antimicrobiană a sîngelui,

* Etanol 50/100 se obține extemporaneu prin diluarea alcoolului absolut cu același volum de apă distilată.

inhibînd fagocitoza şi acţiunea complementului şi, în parte, şi acţiunea antimicrobiană a polimixinei.

Uneori, se recurge şi la un adaos de substanţe hemolizante, fibrinolitice (de ex., streptokinază) şi leucolizante sau de penicilinază, dacă se recoltează sînge de la un bolnav tratat cu penicilină. S-au mai propus însămînţarea sedimentului de centrifugă sau a elementelor rămase pe un filtru de milipor al sîngelui hemolizat şi urmărirea creşterii germenilor pe medii de cultură macroscopic cu lupa sau microscopic, sau prin diferite tehnici delicate. Acestea toate însă constituie tehnici de excepţie sau de cercetare, dar nu pot intra, deocamdată, în rutina laboratoarelor clinice.

Pentru a permite urmărirea comodă a hemoculturilor macroscopic sau cu lupa, este bine ca recipientul să aibă pereţi subţiri şi plani.

Unii germeni se lizează repede, alţii se pot dezvolta rapid, alţii mai lent. Aceştia necesită examinări microscopice (preparat proaspăt şi colorat cu Gram), precum şi repicări pe diferite medii de cultură, la 6—10 ore de la recoltare, la 24 de ore şi la 3 zile, uneori şi mai tîrziu, la 7 zile sau chiar la 20—30 de zile (de ex., pentru brucele).

Pentru aprecieri cantitative şi în cazul infecţiilor mixte, este deci necesar ca însămînţarea să se facă nu numai pe un mediu lichid, dar şi pe unul solid (s-au propus diferite dispozitive pentru culturi primare şi mai ales pentru repicări periodice).

Din toate aceste motive, nu se poate concepe un mediu de cultură universal şi nici o tehnică unică şi optimă de recoltare şi de prelucrare a hemoculturilor. În practică, ne vom mulţumi cu diferite compromisuri, care ar putea satisface situaţiile cele mai des întîlnite.

În general, se recomandă următoarea conduită practică :

2.2.5.0.1. Indicaţiile hemoculturilor (de la cine să se recolteze). Acestea sînt foarte largi ; astfel, principalele indicaţii sînt :

— bolnavi cu febră, frisoane urmate de febră, prostraţie, alterarea senzoriului şi a stării generale, mai ales dacă există o poartă de intrare decelabilă, un focar septic primar şi eventual metastaze septice ;

— apariţia de semne generale (febră, frisoane, alterarea senzoriului etc.), în cursul unor infecţii localizate (pneumonii, infecţii biliare, meningite, infecţii urogenitale, abcese, furuncule, arsuri întinse, plăgi infectate, antrax etc.) sau după explorări sau manopere agresive, cateterisme diverse, mai ales dacă sînt însoţite sau urmate de un şoc endotoxic ;

— stări febrile în infecţii sistemice specifice (febră tifoidă, bruceloză, leptospiroză, gonococemia sau meningococemia sistemică subacută etc.) ;

— stări febrile la bolnavii cu valvulopatii şi intervenţii pe aparatul cardiovascular (proteze, catetere etc.) ;

— stări febrile de etiologie neprecizată ;

— bolnavi cu alterarea progresivă a stării generale, cu febră sau stare subfebrilă, sau chiar fără febră, la prematuri, deficitari imunologic, diabetici, uremici, cirotici, neoplazici, bătrîni caşectici.

În general, mai bine se practică hemoculturi inutile, decît să se neglijeze această analiză, care poate fi hotărîtoare pentru precizarea diagnosticului etiologic.

Scanned with OKEN Scanner

2.2.5.0.2. Recoltarea hemoculturilor. Momentul recoltării și numărul de hemoculturi care trebuie executate. Maximum de șanse de a izola agentul patogen survine atunci cînd recoltarea se face cu 1—2 ore înaintea unui frison (înaintea administrării de antibiotice și chimioterapice), dacă este previzibil, sau la începutul unei ascensiuni febrile, de obicei după masa de prînz. Se poate practica hemocultura oricînd, chiar dacă bolnavul este subfebril sau afebril și dacă boala durează de mai mult timp, în situațiile citate în paragraful anterior.

Se practică întotdeauna 2, de preferință 3 sau chiar mai multe hemoculturi la 1—2 ore interval, de fiecare dată din alt loc, în acord cu indicațiile clinicianului, deoarece *o singură hemocultură poate fi înșelătoare* (dacă este negativă, nu infirmă o septicemie ; dacă este pozitivă, poate fi nesemnificativă). Locul ales pentru puncția venoasă (excepțional se recoltează dintr-o arteră) este la braț pentru adult, la jugulară la copil mic, dar nu de la membrul inferior, și mai ales nu din regiunea inghinală, care nu poate fi bine dezinfectată. Locul puncției trebuie bine curățat pe o arie destul de mare, cu un tampon cu alcool 70%, apoi este frecat cu tinctură de iod, lăsîndu-se să acționeze dezinfectantul cel puțin 1—2 minute. Se procedează apoi la puncția venoasă, avînd grijă de a nu recontamina aria dezinfectată, fie cu mîinile nedezinfectate în prealabil, fie într-alt fel. După prelevarea sîngelui, regiunea este din nou frecată cu alcool 70%, pentru îndepărtarea iodului.

La fiecare prelevare, se distribuie sîngele în mai multe recipiente speciale pentru culturi aerobe, anaerobe și, eventual, pentru unele medii speciale sau se recoltează pe anticoagulant (vezi *2.2.5.0.3.*).

Dispozitive de recoltare. Nu se mai recomandă recoltarea cu seringa și introducerea sîngelui într-un balon cu mediu de cultură și nici astuparea balonului cu dop de vată. Se folosesc *sisteme închise,* pentru a evita contactul sîngelui cu mediul înconjurător. În unele sisteme, sîngele curge prin gravitate, ajutat de presiunea venoasă, din venă în balonul de hemocultură. În general, se preferă flacoane de hemocultură cu *mediu sub vacuum* (0,1 atmosferă și cu CO_2 10%), prevăzut cu un dop sau diafragm de cauciuc, care poate fi perforat cu acul distal al unui dispozitiv de recoltare, al cărui ac proximal este inserat în venă. Asemenea dispozitive, eventual cu mediu „difazic" (lichid și gelozat), sînt comercializate de diferite firme sau pot fi improvizate, mai mult sau mai puțin fericit, prin procedee artizanale. În fig. 27, se redau cîteva asemenea dispozitive.

Recoltarea se face de o persoană bine instruită, conștiincioasă și cu o bună manualitate, respectînd cu deosebită scrupulozitate reguli severe de asepsie.

Cantitatea de sînge prelevat este de 1—2 ml, la sugari și la copii mici, și de 10—30 ml, la adulți. Proporția de sînge față de mediu este 1 volum de sînge pentru cel puțin 10 sau mai multe volume de mediu. Dacă bolnavul a luat antibiotice, se va întrerupe tratamentul pe cel puțin 12—24 de ore și proporția de sînge față de mediu va fi de cel puțin 1 la 20.

După introducerea sîngelui în flaconul de hemocultură, acesta se agită uşor, pentru a asigura amestecul, dar fără a produce spumă şi fără să se ude dopul flaconului (mai ales dacă se mai utilizează dopuri de vată).

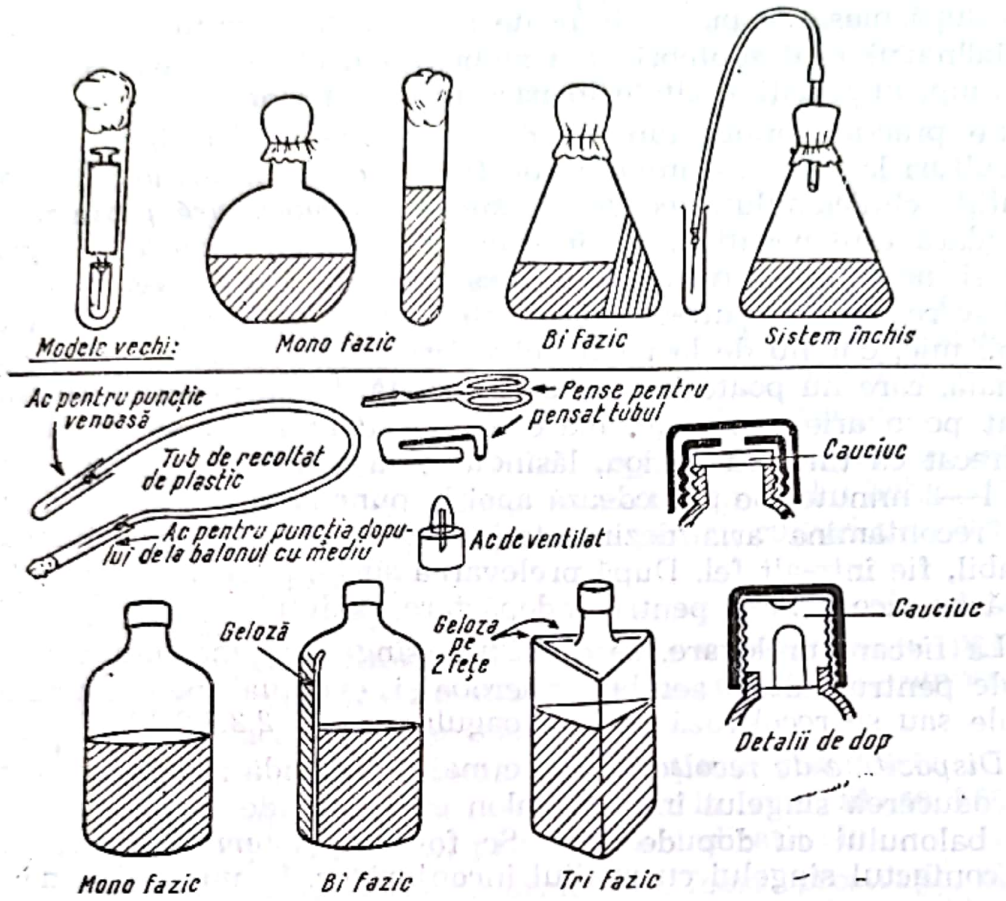


Fig. 27. — Recoltoare şi flacoane de hemocultură.

2.2.5.0.3. Medii de cultură. Sîngele recoltat se repartizează în unul sau, de preferinţă, în 2 medii de cultură (pentru aerobi şi anaerobi), precum şi într-un flacon cu un anticoagulant (vezi mai jos).

Rezultatul hemoculturilor depinde nemijlocit de calitatea mediilor de cultură. Vom indica acelea care la ora actuală dau cele mai bune rezultate şi care probabil vor fi introduse în curînd şi în ţara noastră, precum şi unele medii mai simple, dar mai accesibile.

Pentru germeni aerobi, se poate folosi cu aceleaşi rezultate, fie bulion „Tripticase Soy Broth", cu digestie triptică de cazeină şi papainică de soia ; fie bulion inimă de bou-creier Columbia, ambele cu adaos de sodium polianetol sulfonat (S.P.S. = Liquoid^{R}), în concentraţia finală de 0,025—0,050%, cu funcţia de anticoagulant, inhibitor al fagocitozei şi al complementului seric, al acţiunii antimicrobiene a aminoglicozidelor şi a polimixinelor. Se adaugă agar — 0,5 g/1 000 ml, pentru a creşte puţin

vîscozitatea mediului. Dacă se adaugă gelatină 1,5%, se asigură o mai bună creştere a meningococilor, a peptostreptococilor şi a streptobacilului moniliform.

Sodium-Amil Sulfonatul (S.A.S.) este net inferior şi tinde să dispară în favoarea S.P.S.

Mediul nu va conţine thioglicolaţi, dar trebuie menţinut în vacuum (0,1 atmosferă, cu CO_2 în proporţie de 1,0%), în flacon ermetic închis (vezi şi fig. 27). După recoltarea sîngelui, flaconul va fi „ventilat" (vezi *2.2.5.0.4.*).

În lipsa acestor medii se poate folosi mediul nr. 1 al Institutului Cantacuzino sau chiar un simplu bulion glucozat 0,2%, însă cu rezultate mai slabe.

Pentru germenii anaerobi. Avînd în vedere că, în 10—20% din cazuri, pot interveni infecţii cu anaerobi sau infecţii mixte (aerobi cu anaerobi), este necesar să se utilizeze şi un mediu pentru anaerobi. Se poate folosi acelaşi mediu Tripticase Soy Broth sau Columbia, dar cu adaos de 0,7% agar, 2,5 g dextroză, şi 0,5 cisteină sau (şi) 0,5 thioglicolat de sodiu la litru, preredus, şi eventual cu un indicator redoxo (rezaurină 0,003 g la litru, sau leucoderivatul de albastru de metilen). În lipsă, se poate utiliza bulion V.F. (viande-foie) preredus şi cu adaos de thioglicolat de sodiu şi agar cîte 0,5% la litru. Mediile pentru anaerobi sînt menţinute sub vacuum sau prereduse (prin fierbere şi sub controlul indicatorului redoxo), înainte de utilizare.

Pentru diverse alte culturi speciale, se mai poate recolta în aceleaşi condiţii ca pentru hemocultură sînge pe anticoagulant (cîte 1 ml soluţie 0,30—0,50% de S.P.S. pentru 10 ml sînge). Din acest sînge, transportat imediat la laborator, se poate încorpora cîte 1 ml la 10 ml în geloză topită şi răcită la 5°. După amestecul cu sîngele, geloza va fi turnată în cutie Petri, pentru a putea avea eventual o apreciere cantitativă şi proporţională între diverşi germeni, care ar putea creşte în aceste condiţii. Se pot face 2 cutii, una pentru aerobi, incubată în atmosferă cu CO_2 la 10%, şi alta pentru anaerobi, cu un mediu preredus şi incubat în condiţii de anaerobioză, fie prin plasarea cutiei într-un vas („Candle jar") sau într-un exicator, care se închide etanş şi în care se lasă să ardă pînă se stinge spontan o lumînare albă (prin ardere, se consumă oxigenul şi se eliberează CO_2) *. Sau se realizează anaerobioză folosind un amestec reducător într-un spaţiu închis (pulbere livrată cu instrucţiuni de folosire de către Institutul Cantacuzino).

S-au obţinut rezultate foarte bune şi cu un mediu unic, şi anume un bulion bun (de ex., Columbia sau „Triplicase Soy") 1 000 ml cu agar 0,5 g, 0,5 g cisteină, liquoid 0,5 g, fiert 30 minute, repartizat în tuburi de 25 mm ∅/200 mm lungime cîte 60 ml, sterilizat la autoclav la 120°, timp de 15 minute. Se însămînţează cu 5—8 ml sînge şi se încubează aerob. Aerobioza scade treptat de la suprafaţa mediului, spre

* Pentru ca borcanul să nu se spargă, se fixează la 5—7 cm peste flacăra lumînării, un ecran de azbest.

fundul tubului, unde se menţine o anaerobioză strictă. Transplantele se fac de la diferite niveluri.

Se mai poate însămînţa sînge pe geloză şocolată sau se repartizează cîte 1 ml sînge în mai multe tuburi cu medii de cultură, printre care eventual şi mediul Sabouraud lichid pentru fungi. Unii germeni (de ex., leptospire şi alţii) necesită medii de cultură speciale. Ele vor fi semnalate, atunci cînd se vor descrie germenii respectivi (vezi cap. *3*).

Dacă nu se dispune de cele necesare, la nevoie, se utilizează un singur mediu lichid, de ex., mediul nr. 1, pentru aerobi, şi bulionul V.F. preredus, pentru anaerobi, ambele medii produse şi livrate de Institutul Cantacuzino din Bucureşti.

Mersul operaţiunilor de prelevare, însămînţare este reprezentat schematic în fig. 28.

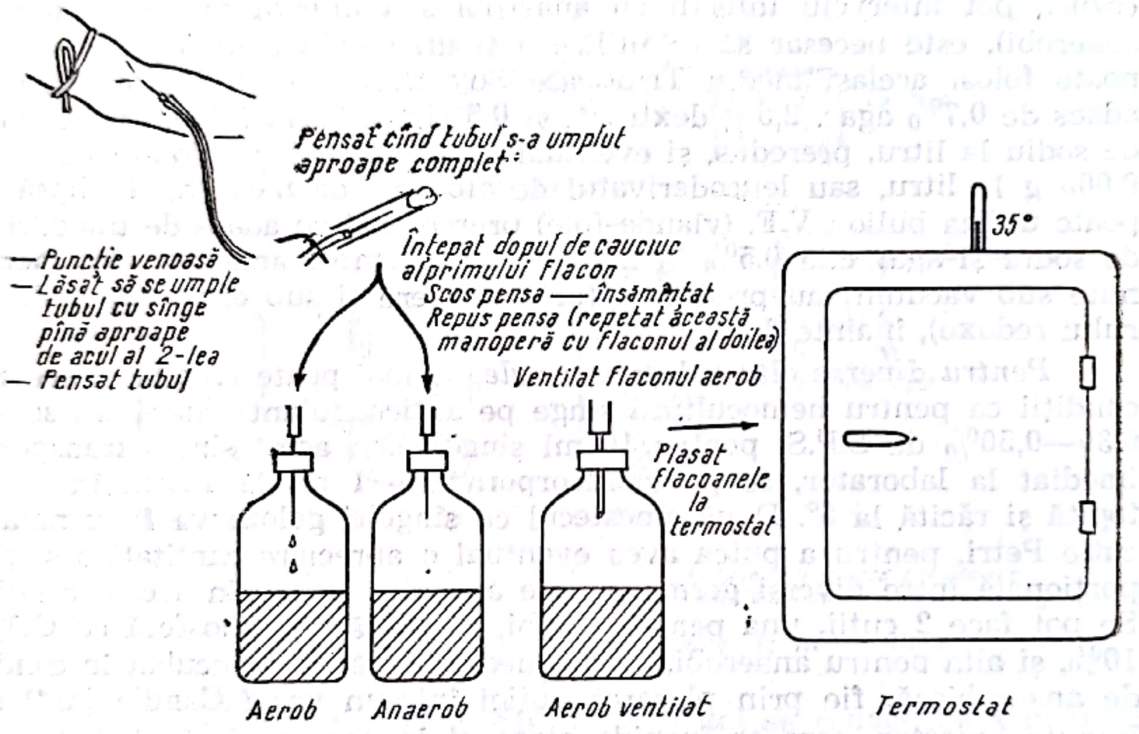


Fig. 28. — Hemocultura. **Recoltare.**

2.2.5.0.4. Condiţii de incubare. Incubarea hemoculturilor în aerobioză, cu CO_2 sau în „Candle jar", sau în anaerobioză strictă se face la 35° *.

Dacă, pentru aerobi, s-a folosit balonul cu vacuum şi CO_2, acesta trebuie „ventilat", prin înţeparea dopului cu un ac de seringă steril prevăzut cu un filtru de vată, prin care pătrunde aer pînă la echilibrarea cu presiunea atmosferică. Aceasta se realizează în cîteva secunde, după care se scoate acul, ca să nu se piardă CO_2 necesar pentru creşterea

* În unele situaţii speciale (culturi din sînge conservat pentru depistare de Yersinia şi bacili gramnegativi, care pot infecta sîngele conservat), incubaţia trebuie făcută după caz şi la temperaturi mai joase (18—30°).

multor germeni. Aerul pătruns în flacon este necesar creşterii germenilor strict aerobi (piocianic, hemofili, neisserii patogene, candide).

2.2.5.0.5. Controlul, pozitivarea hemoculturilor. În cazuri grave, hemoculturile sînt controlate vizual cu ochiul liber, cu lupa, făcîndu-se prelevări pentru examene microscopice şi efectuîndu-se subculturi, de 3 ori în primele 24 de ore de la recoltare (la 6, 12 şi 24 de ore). În cazurile obişnuite, examinarea macroscopică şi cu lupa se face zilnic, iar prelevări pentru examen microscopic şi pentru subculturi se fac la 24 de ore, la 3 zile şi la 7 zile (eventual, în cazuri speciale şi mai mult), sau de îndată ce se observă o modificare a hemoculturii (hemoliză, tulburare, apariţia de grunji într-un cheag subţire de fibrină sau la limita dintre bulion şi sedimentul hematic). La intervalele indicate mai sus, se fac prelevări şi transplante, uneori *ţintite,* din fundul, de la mijlocul şi de la suprafaţa mediului sau din micii grunji (colonii mici prinse în fibrină), care pot fi observaţi, uneori, fie la limita superioară a depozitului hematic, fie suspendaţi într-o reţea de fibrină (stafilococii coagulazopozitivi).

Trebuie făcute însă şi *prelevări* şi *transplante oarbe* (la intervalele indicate), chiar dacă mediul pare nemodificat, deoarece hemofilii, neisseriile patogene, Bacteroides, Fusobacterium, pneumococul şi chiar piocianicul şi bacteridia carbonoasă se pot dezvolta în stratul hematic în hemoculturi, fără să producă, cel puţin la început, modificări vizibile ale mediului. Pentru anaerobi, subculturile oarbe sînt inutile în primele 24 de ore. Ele se fac la 48 de ore, la 3 şi la 7 zile de la recoltare.

La bolnavii, care au primit antibiotice, în unele cazuri-problemă şi la acei la care se suspectează o bruceloză sau o micoză sistemică, hemoculturile sînt păstrate şi examinate pe o perioadă mai lungă, de 3 (4) săptămîni.

Din cantitatea prelevată, se fac examene microscopice *native* (între lamă şi lamelă, examinate cu obiectiv $\times 40$ şi imersie), precum şi *frotiuri colorate* cu albastru de metilen şi Gram. Se fac şi transplante pe medii speciale : geloză, geloză-sînge, geloză şocolată, mediu anaerob etc. Incubarea transplantelor se face după caz, în orice caz în aerobioză, sau după caz în atmosferă cu CO_2 sau/şi în anaerobioză.

Prelevările şi transplantele se fac cu deosebită grijă, pentru a evita suprainfecţiile şi contaminările incidentale ; din această cauză, se lucrează în nişe sau într-un loc ferit de curenţii de aer. Se folosesc fie seringi tip Luer, montate cu ace lungi ca de punctie lombară şi sterilizate la autoclav, utile pentru recoltările ţintite, fie seturi speciale de recoltare-transplant, în sistem închis. Înainte şi după recoltare-transplant, se dezinfectează cu grijă dopurile flacoanelor. Se mai pot folosi (deşi mai puţin recomandat) pipete Pasteur montate cu pere de cauciuc sterile, sau montate pe un tub mai lung de cauciuc, prevăzut la celălalt capăt cu un muştiuc steril. Se contraindică, din cauza riscului de contaminare, folosirea de pipete Pasteur, prin care se aspiră de-a dreptul cu gura.

Dacă se foloseşte un dispozitiv bifazic (tip Castaneda), cu bulion şi geloză, inspecţia vizuală se face prin grosimea sticlei, iar însămînţarea gelozei se face prin simpla înclinare a flaconului, fără a-l deschide.

Scanned with OKEN Scanner

După recoltare-transplant, se agită binişor flaconul de hemocultură şi se repune la termostat.

Mersul operaţiilor de control, prelevare şi transplant este reprezentat schematic în fig. 29.

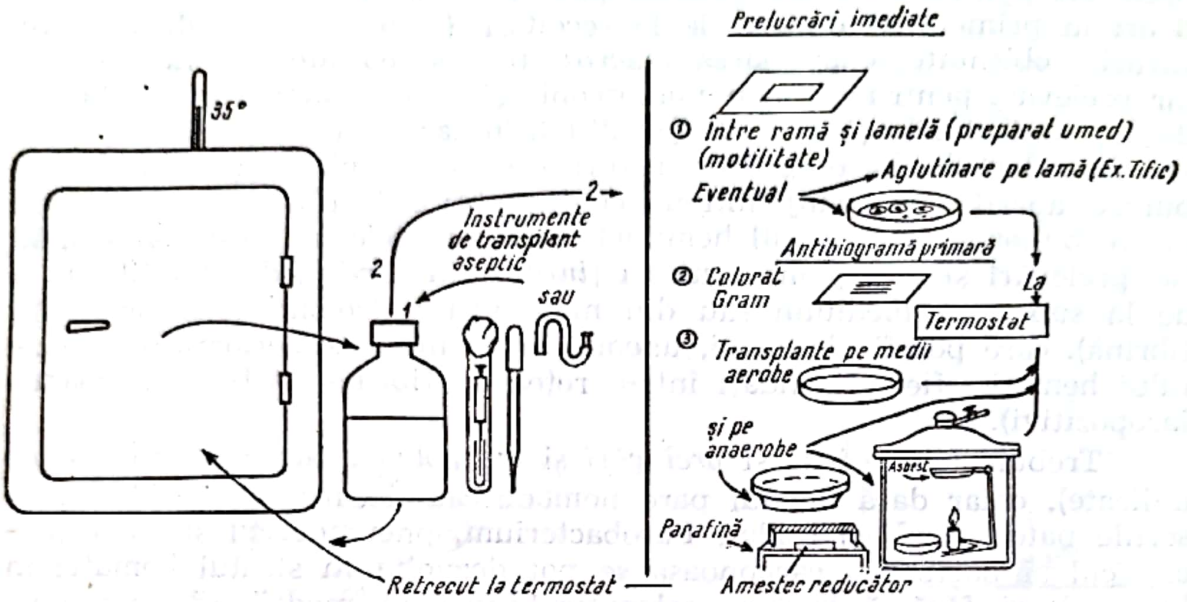


Fig. 29. — Hemocultura. Transplantele aseptice se efectuează : cu seringa Luer cu ac lung sau cu pipeta Pasteur montată sau cu ansa (din coloniile crescute pe geloză în flacoanele bifazice). Se face transplant orb la 12 şi 24 ore. Se fac transplante la 3—7 (14) zile. Se inspectează zilnic.

Transplantele se fac pe medii solide (rareori şi pe medii lichide), aerobe şi anaerobe. Cînd se suspectează o infecţie cu germeni enterali sau oportunişti, transplantele pot fi făcute pe geloză simplă, dar în toate celelalte cazuri, mai ales dacă poate fi vorba de germeni mai pretenţioşi (streptococi, hemofili, neisserii patogene etc.), transplantele trebuie făcute pe geloză-sînge şocolată, eventual îmbogăţită cu factori de creştere (de ex. *X* şi *V*, pentru hemofili). Incubarea ulterioară se face după caz, în aerobioză, în atmosferă cu CO_2, sau în anaerobioză.

2.2.5.0.6. Situaţii speciale. Bolnavii, la care s-au aplicat şi păstrat catetere intravenoase (de ex., în cazul unei terapii intensive), pot face septicemii „de cateter" şi, din această cauză, trebuie controlat cu deosebită grijă locul de inserţie a cateterului. Cînd se scoate cateterul, vîrful lui se taie aseptic şi se rostogoleşte pe suprafaţa unei geloze-sînge (şi pe mediu Sabouraud). În septicemiile de cateter, se dezvoltă de obicei un număr mare de colonii izolate sau chiar confluente, în timp ce altfel nu se dezvoltă nimic sau doar foarte rare colonii, de obicei de stafilococ epidermidis.

2.2.5.0.7. Interpretarea şi comunicarea rezultatului provizoriu şi definitiv către clinician. În infecţii severe cu stafilococi sau cu bacterii enterale aerobe (şi unele anaerobe), cu condiţia expresă ca să se utilizeze medii de cultură superioare (vezi *2.2.5.0.3.*), hemocultura se poate pozitiva în primele 3—8 ore de la recoltare, permiţînd punerea în evidenţă

microscopică a germenilor și impunînd : executarea de subculturi pe medii potrivite, anunțarea neîntîrziată (telefonică) a clinicianului și, eventual, executarea unei antibiograme primare. Rezultatele sînt provizorii și trebuie confirmate prin examene ulterioare. Dacă se lucrează în condiții bune, marea majoritate a hemoculturilor se pozitivează în 3—7 zile. În unele boli grave, de etiologie neprecizată, la bolnavii care au primit antibiotice și în suspiciunile de bruceloză și de micoze sistemice, hemoculturile vor fi supravegheate în continuare 21—25 de zile.

Izolarea în două sau în mai multe hemoculturi a unor germeni (stafilococ auriu, streptococ piogen, pneumococ, piocianic, bacteridia cărbunoasă, specii de Bacteroides, clostridii, enterobacteriacee, Haemophilus influenzae, neisserii patogene, Pasteurella, Listeria etc.) au o mare valoare de diagnostic etiologic. Hemoculturile cu streptococ viridans sau cu streptococ din grupul D vor fi luate în considerare cu rezervă ; hemoculturile cu stafilococ epidermidis (deși constituie cel mai frecvent contaminant), cu difteroizi, cu propionibacterii și alți saprofiți obișnuiți de pe piele, *nu trebuie considerați,* ipso facto, ca germeni de contaminare (ceea ce sînt deseori), deoarece ei pot fi responsabili de endocardite subacute, de infecții de cateter sau de implante prostetice (proteze valvulare etc.), mai ales la bolnavii cu putere de apărare deficitară. Rolul patogen al acestora devine probabil, dacă se izolează în mai multe hemoculturi consecutive și, mai ales, dacă argumentele clinice pledează pentru aceasta. Decizia o va lua clinicianul, bazat pe criterii complexe statistice, epidemiologice, evolutive, leziuni cu prezența acestor germeni, anticorpi circulanți specifici față de acești germeni etc.

Deoarece în multe septicemii severe, hemocultura se pozitivează în primele 24 de ore, este bine ca însuși clinicianul să-și completeze vizita la laborator, pentru a discuta anumite probleme practice cu medicul de laborator.

Rezultatul hemoculturilor trebuie raportat imediat clinicianului pe etape : germeni izolați, germeni cultivați, antibiogramă (eventual primară și orientativă), apoi la nevoie una prin diluții, cu determinare de CMI și CMB și, în fine, identificarea germenului. Tulpinile izolate sînt conservate la laborator pe tot timpul bolii (în general, 10—15 zile) și eventual trimise la laboratorul C.S.A. sau la laboratorul de profil al Institutului Cantacuzino. Clinicianul are datoria să anunțe laboratorul dacă nu mai este cazul să se păstreze unele tulpini sau dacă nu mai este cazul să se continue investigațiile.

2.2.6. ANALIZE SIMPLE, ELEMENTARE DE IMUNOLOGIE

În ultimele decenii, s-au făcut mari progrese în cunoașterea mai intimă a fenomenelor imunitare și s-au imaginat noi metode și noi tehnici de punere în evidență a unor cantități infime de antigene și de anticorpi, cu separarea fracțiunilor IgG, IgM, IgA și IgE. În privința fenomenelor, care pot fi încadrate în imunitatea celulară (fenomene specifice și nespecifice), cu toate progresele făcute, ele rămîn încă cu

Scanned with OKEN Scanner

multe necunoscute şi cu sisteme de explorare mai limitate şi mai puţin satisfăcătoare.

Progresele practice înregistrate se referă, în primul rînd, la o serie de explorări de strictă specialitate, care se execută în laboratoare de profil.

S-au imaginat însă o serie de analize, care nu necesită nici o aparatură şi nici o tehnicitate deosebită, ele putînd fi executate la patul bolnavului sau pe o simplă lamă de sticlă sau de plastic, sau în plăci şi cutii special preparate, la care nu rămîne decît să se adauge substanţa de cercetat (de ex., ser sanguin, L.C.R., urină etc.). Citirea se face cu ochiul liber. În afară de acestea, mai sînt şi alte analize, în care citirea se face cu microscopul obişnuit sau în lumină ultravioletă. În această categorie, intră preparatele de imunfluorescenţă, care sînt însă mai pretenţioase.

Dacă executarea şi citirea primelor tipuri de analiză este foarte simplă, în schimb, prepararea ingredientelor este deseori delicată şi cere o mare acurateţă, care nu se poate obţine decît în laboratoare bine utilate şi încadrate sau trebuie să se recurgă la produse livrate de-a gata de către firme producătoare, de înaltă calificare.

De asemenea, trebuie observat că rezultatele obţinute sînt de multe ori orientative şi calitative, cel mult semicantitative. Multe dintre analizele acestea sînt însoţite de un martor negativ şi de unul pozitiv intens. Ar trebui însă specificat pînă la ce diluţie a martorului pozitiv se mai poate citi reacţia, deoarece altfel, pe măsură ce reactivii se degradează, prin învechire sau printr-o conservare nepotrivită, reacţia cu martorul rămîne pozitivă, dar posibilitatea de decelare a diferitelor probe scade treptat.

2.2.6.0.1. Intradermoreacţiile (I.D.R.). Analizele imunologice cele mai simple de executat la patul bolnavului sînt acelea prin *intradermoreacţii.* Unele se bazează pe neutralizarea unei toxine eritrogene injectată local intradermic de către anticorpii circulanţi ai pacientului cercetat (reacţia Schick şi Dick) ; altele reprezintă o reacţie de sensibilitate la un alergen, care se manifestă rapid printr-o vasodilataţie locală cu eritem şi, eventual, şi edem la locul injecţiei ; în alte I.D.R., mecanismul constă în producerea mai lentă a unei migrări şi aflux de macrofage şi limfocite la locul de injecţie a antigenului, ceea ce produce o infiltraţie, care apare după (24)—48—72 de ore : reacţii întîrziate de tip tuberculinic.

Acest ultim tip de reacţii pot indica o stare de *hiperergie,* cu o reacţie foarte violentă sau una pozitivă de diferite grade. Reacţia negativă indică lipsa unui contact anterior cu antigenul injectat, dar şi o stare de *anergie,* de lipsă de reactivitate a sistemului imunitar tisular faţă de un antigen, cu care a mai venit în contact, dar faţă de care nu mai poate reacţiona.

S-au imaginat şi pus la punct o serie de antigene pentru intradermoreacţii, dintre care citäm I.D.R. pentru : bruceloză, tularemie, infecţii cu Yersinia, tuberculoză (P.P.D. fiole cu 2 U.I./0,1 ml şi cu 10 U.I./0,1 ml.), difterie, infecţii streptococice etc. precum şi pentru aspergiloză, blastomicoză, histoplasmoză, sporotricoză, tricofiţie şi alţi fungi ; pentru echinococoză, cisticercoză, hidatidoză, leishmanioză, para-

gonimiază, schistosomiază, toxoplasmoză, trichineloză etc. Dintre toate acestea, numai o mică parte pot fi procurate în mod curent (P.P.D., toxina Schick, brucelină, tularină şi antigen streptococic şi de Yersinia enterocolitica). Antigenele sînt astfel titrate încît cantitatea de injectat intradermic este de 0,1 ml. Citirea se face cu ochiul liber după 1/2—24—(48) ore, pentru reacţiile rapide, şi după 72—96 de ore, pentru cele întîrziate. Diametrul zonei eritematoase se măsoară (în două direcţii), pentru primele tipuri de reacţii ; pentru reacţiile întîrziate, se măsoară diametrul zonei infiltrate. Intensitatea reacţiei se notează fie cu plusuri (+, ++, +++, +++++), fie (mai bine) în mm diametru. Reacţiile total negative sau reacţiile sub 10 mm diametru se socotesc negative. Reacţiile foarte intens pozitive pot fi flictenulare, ulcerative, cu necroză, care persistă mai multe zile (sau chiar săptămîni), sau cu limfangită şi adenită satelită.

Intradermoreacţiile sînt supuse la 3 tipuri de erori şi anume la acelea date de calitatea substanţei injectate (titrare necorespunzătoare, alterare sau perimare), la acelea date de însăşi tehnica de execuţie (injectare subdermică, injectare de o doză prea mare sau prea mică prin pierderi ; vezi fig. 30) şi, în fine, erori de citire.

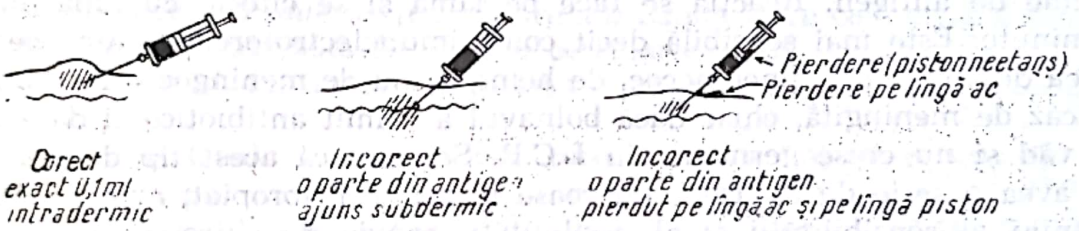


Fig. 30. — Intradermoreacţia şi greşeli posibile.

Pentru testarea unei eventuale stări de *anergie* (poate trecătoare), se poate recurge la o serie de intradermoreacţii de tip întîrziat cu antigene cu care mai toţi oamenii au intrat în contact. S-au propus următoarele antigene : Trichophyton, Candida, oreion, streptokinază, streptodornază şi P.P.D. (derivat purificat de proteină de bacil Koch). La persoanele normale, se observă după 24—48 de ore cel puţin 2, dacă nu mai multe reacţii pozitive ; la persoanele cu o anergie relativă abia una va fi pozitivă, iar la anergici toate vor fi negative. La bolnavii chirurgicali, s-a observat o strînsă relaţie între starea de anergie şi procentul ridicat de infecţii şi de moarte, şi dimpotrivă un prognostic bun la acei cu o reactivitate normală. Printr-un tratament potrivit, se poate deseori readuce bolnavul din starea de anergie într-o stare de reactivitate normală, combătînd pe cît se poate cauzele care au determinat anergia. Acestea sînt, de obicei, următoarele : malnutriţie, hipoproteinemie, sîngerări, traumatisme, şoc, infecţii diverse (localizate sau sistemice acute, ca de ex. rujeola, gripa etc.), şi în sfîrşit o vîrstă înaintată.

2.2.6.0.2. Reacţii rapide pe lamă. În această categorie, s-au făcut în ultimele decenii mari progrese, imaginîndu-se reacţii de acest tip pentru foarte multe situaţii. Ele toate prezintă însă greutatea de a avea mereu la dispoziţie ingredienţi activi, bine titraţi şi în termenul lor de valabilitate. Ele se pot face amestecînd pe o lamă o picătură din serul bolnavu-

Scanned with OKEN Scanner

lui cu un anume antigen şi urmărind dacă se produce o aglutinare vizibilă cu ochiul liber (şi cu lupa). Pentru uşurarea reacţiei, unele antigene corpusculare au fost colorate. Citäm astfel de reacţii pentru : bruceloză, tularemie, yersinioză, febra tifoidă şi febra paratifoidă şi aglutinare de proteus OX_{19}, pentru tifos exantematic. În locul antigenelor bacteriene, se mai folosesc alte substanţe corpusculare încărcate cu antigen G, de ex. hematii de cal pentru diagnosticul mononucleozei infecţioase, particule de latex sau alt suport corpuscular pentru o serie de infecţii bacteriene şi parazitare şi pentru decelarea de diverşi factori, ca factorul reumatoid, factorul antinuclear etc. Tot pe lamă, se pot face reacţii pentru lues (VDRL pe lamă), pentru sarcină şi altele.

În toate aceste cazuri, se va citi cu atenţie buletinul care însoţeşte antigenul, care urmează a fi folosit, şi se va executa reacţia conform indicaţiilor date.

O reacţie pusă recent la punct, dar care nu a ajuns încă în practica laboratoarelor noastre de teren, este *coaglutinarea stafilococilor cu proteina A* încărcată cu anticorpi specifici, capabilă să deceleze cantităţi infime de antigen. Reacţia se face pe lamă şi se citeşte cu lupa după 2 minute. Este mai sensibilă decît contraimunelectroforeza pentru decelarea de antigen de pneumococ, de hemofil sau de meningococ în L.C.R., în caz de meningită, chiar dacă bolnavul a primit antibiotice şi dacă nu se văd şi nu cresc germeni din L.C.R. Se pare că acest tip de reacţie va avea o serie de aplicaţii valoroase în viitorul apropiat, avînd dublul avantaj al sensibilităţii şi al posibilităţii rapide de citire, fără o aparatură specială.

2.2.6.0.3. Reacţii de precipitare în tub capilar sau în gel (de agarozä). Deşi de o execuţie simplă, ele nu sînt efectuate în punctele minimale de laborator, deoarece — pe de o parte — cer măsurarea *precisă* a unei cantităţi foarte mici de aer (sau de alt produs) şi — pe de altă parte — citirea se face de obicei abia a doua zi (adică nu sînt teste foarte rapide). Pregătirea gelului poate fi pretenţioasă şi nu poate fi făcută decît în laboratoarele de profil sau trebuie să se procure cutii livrate gata de utilizare de către firme producătoare de înaltă calificare.

Vom cita numai cîteva :

2.2.6.0.3.1. Proteina C reactivă, test nespecific care se pozitivează în serul bolnavilor cu un proces inflamator acut, în puseuri acute de reumatism articular acut, în infarctul de miocard şi în neoplazii. Se introduce un tub capilar în ser antiproteină C reactivă (livrat de Institutul Cantacuzino), pînă cînd coloana de lichid ajunge la aprox. 2—3 cm. Se şterge vîrful capilarului şi apoi se introduce în serul *perfect limpede* al bolnavului şi se lasă să se suie tot atît cît şi serul anti. Se amestecă binişor cele 2 seruri prin înclinarea şi rotirea capilarului, evitînd cu grijă să nu intre bule de aer în capilar, după care capilarul este implantat într-o mică grămăjoară de plastilină pusă pe o lamă de sticlă. A doua zi se citeşte : lipsa de precipitat indică o reacţie negativă, iar un

precipitat sedimentat la partea de jos a coloanei de lichid indică o reacţie pozitivă, care este apreciată cu plusuri (+, ++, +++-+) (fig. 31).

2.2.6.0.3.2. Dubla difuziune în gel (Ouchterlony) constă din executarea într-un strat subţire de agaroză turnată pe o lamă de sticlă a două godeuri de cca 3 mm ∅, cu distanţa între ele de 3 mm. Într-unul se pune un antigen solubil şi în celălalt anticorpul corespunzător. După

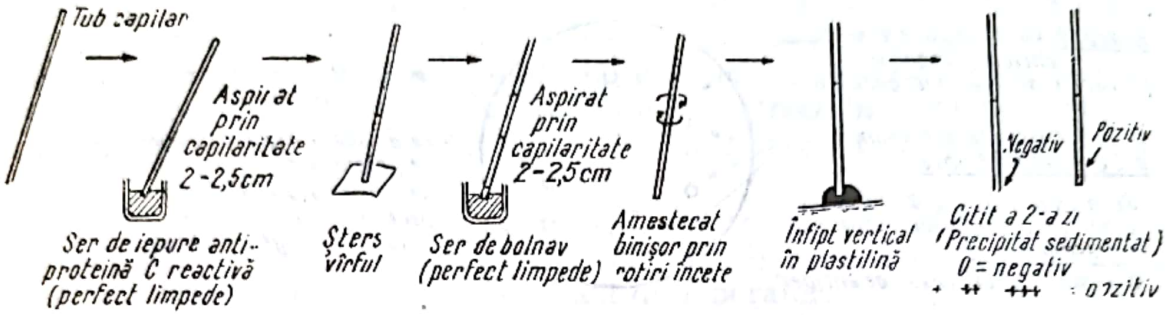


Fig. 31. — Proteina C-reactivă.

cîteva ore, apare o linie de precipitare alb palidă între cele două godeuri. Reacţia poate fi utilizată fie pentru cercetarea unui antigen folosind un anti-ser cunoscut, fie invers, cercetarea unui anticorp folosind un antigen cunoscut.

Teĥnica Ouchterlony. Se vor respecta prescripţiile referitoare la gelul de agaroză şi anume se lasă peste noapte să se moaie 0,80 g agaroză în 50 ml apă distilată. A doua zi, se adaugă 50 ml tampon veronal medinal (veronal 1,85 g, medinal 10,3 g, apă distilată 1 000 ml, eventual cu un adaos de 0,01 g mertiolat de sodiu). Se fierbe ca să se dizolve bine, se filtrează şi se poate păstra la rece 1—2 luni. Se toarnă în strat subţire pe o lamă de sticlă. Pe o lamă obişnuită de sticlă se pot face mai multe reacţii (fig. 32).

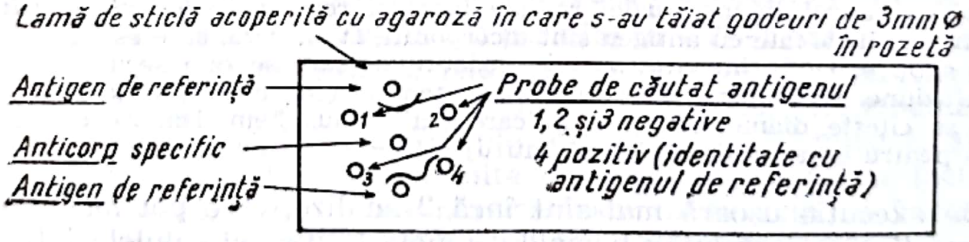


Fig. 32. — Imunodifuziunea dublă în gel de agaroză (Ouchterlony).

Imunodifuzia radială (testul Mancini). Se încorporează în agaroză (vezi mai sus) un antigen (sau anticorp) cunoscut şi se toarnă în strat subţire pe o lamă de sticlă sau în mici cutii de plastic, cu fundul perfect plan. În gel, se taie o serie de godeuri, în care se pun, pe de o parte, diluţii cunoscute de anticorpi (sau respectiv antigen) pentru titrare şi, pe de altă parte, produsul de cercetat. Prin difuziune, se realizează un contact între antigen şi anticorp. Pe suprafaţa de contact între antigen-

anticorp, se produce o precipitare, care apare ca un disc albicios, a cărui dimensiune este proporțională cu concentrația produsului cercetat (fig. 33).

Tehnica Ouchterlony și Mancini se pretează pentru un mare număr de analize de diferite feluri, precum și la analize în serie, în funcție de reactanții folosiți. S-au făcut pentru diferite scopuri anume „imunoplăci", cu care se poate

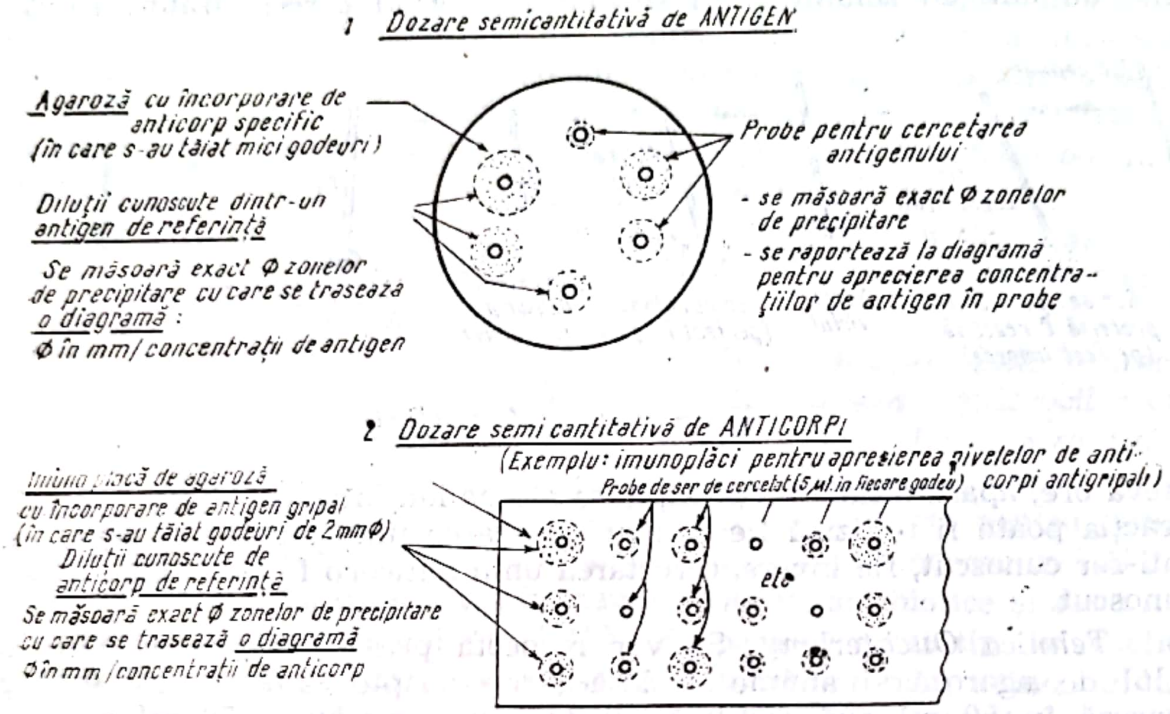


Fig. 33. — Imunodifuziunea radială (Mancini).

decela și aprecia semicantitativ diferitele fracțiuni de globuline IgG, IgM, IgA, complement, produse de degradare a fibrinogenului și o serie de anticorpi. Imunoplăcile se pretează la urmărirea nivelului de anticorpi, față de o anumită boală (de ex., gripă), în cadrul unei populații. Aceste cercetări se fac în laboratoarele de profil, dar nu la patul bolnavului și de aceea nu le vom descrie aici.

Tot în cadrul imunodifuziei radiale intră și reacția de *hemoliză radială*, în care eritrocite încărcate cu antigen sînt încorporate în agaroză, care este apoi turnată în strat subțire. După întărire, se taie godeuri, în care se pun seruri de cercetat. După difuziune, se acoperă placa cu complement (ser de cobai), se lasă să reacționeze și se citește diametrul zonei în care s-a produs hemoliza. Reacția poate fi utilizată pentru detecția de anticorpi antirujeolă.

De execuție ușoară mai sînt încă 2 analize, care pot da informații foarte prețioase și anume : hemaglutininele la rece și celulele L.E.

2.2.6.0.4. Hemaglutininele la rece. În „pneumonia primară atipică", infecții cu Mycoplasma pneumoniae (denumită la început agentul Eaton) apare, mai ales în formele mai severe, către a doua săptămînă de boală, crescînd în dinamică, aglutinine la rece față de hematiile proprii ale bolnavului. Se fac diluții binare de ser (în 5—6 tuburi), începînd cu 1/32 (3,1 ml soluție clorurosodică 0,85/100 ml, plus 0,1 ml ser de la bolnav), fie în tuburi, fie pe plăci în godeuri. Se adaugă hematii proprii spălate în soluție clorurosodică 0,85/100 ml, în proporție 1/4 și se pun tuburile la +4°. După 1/2 oră, se poate constata, în cazul reacției pozi-

tive, o aglutinare a hematiilor, care dispare la 37°, şi reapare la rece. Un titru de peste 1/64 este semnificativ, mai ales dacă este încă mai înalt, dacă creşte în dinamică în convalescenţă şi scade apoi în săptămînile următoare. Testul nu este patognomonic, dar este totuşi util.

2.2.6.0.5. Celulele L.E. şi fenomenul L.E. (vezi şi *2.2.1.0.4.*). *Factori antinucleari.* În sîngele periferic, în lupusul eritematos diseminat, mai ales în fazele acute ale bolii, mult mai rar în alte afecţiuni, poate să apară un factor antinuclear, care duce la alterarea unor nuclee de leucocite, cu formarea unor mase amorfe hematoxilinice de culoare roz-violacee cu coloraţia Giemsa (corpusculii L.E.), care sînt apoi fagocitate de polinucleare, formînd celulele L.E. Fenomenul se petrece *in vitro,* pe elemente uşor traumatizate şi este favorizat de coagulare şi în prezenţa unei cantităţi normale de complement.

Factorii antinucleari pot fi puşi în evidenţă prin tehnica celulelor L.E. sau printr-o tehnică mai fină şi mai sensibilă de *imunofluorescenţă,* care însă necesită o înzestrare specială de laborator.

Este bine de ştiut că, în ultimii ani, s-au pus la punct o serie de *tehnici rapide,* care permit în mai puţin de 1/2—1 oră, să se precizeze un diagnostic etiologic, într-o serie de boli grave, folosind metode imunologice fine. Aceste tehnici cer însă o anumită aparatură şi ingrediente, care pot fi scumpe şi greu de procurat sau de o validitate redusă, ceea ce limitează posibilităţile lor practice de aplicare.

Reacţiile propriu-zise cer puţin timp şi citirea se face uşor, dar pregătirile anterioare indispensabile pot fi mult mai lungi, migăloase şi cer o mare acurateţe în execuţia lor. Din aceste motive, aceste tehnici — deşi rapide şi extrem de utile, uneori pentru introducerea rapidă a unui tratament salvator — nu sînt practic la îndemîna clinicianului, ocupat cu îngrijirea bolnavilor săi, dar trebuie executate în laboratoare mai bine încadrate şi echipate.

Citäm patru tipuri de asemenea analize, cu menţiunea că în unele ţări industrializate s-au şi comercializat aparate, dispozitive, reactanţi şi semifabricate, de unică utilizare, care uşurează considerabil munca.

2.2.6.0.6. Imunfluorescenţa (I.F.) permite în 1/2—1 oră recunoaşterea şi identificarea dintr-un produs patologic a o serie de bacterii (bacili difterici toxigeni, streptococi beta-hemolitici grup A, Treponema pallidum, Bacteroides fragilis etc.), unele virusuri, unele micoze, şi unii paraziţi intracelulari. Tehnica permite evidenţierea rapidă a factorului antinuclear în serul unor bolnavi, recunoaşterea în urină a bacteriilor, care provin dintr-o infecţie a căilor urinare inferioare, şi a bacteriilor, care provin din căile urinare superioare. Ea permite uneori, cu anumite artificii, recunoaşterea etiologiei exacte în cazuri de endocardită cu hemoculturi negative. Tehnica însă cere o instalaţie specială de microscopie în ultraviolet, seruri specifice cuplate cu fluorocromi, iar citirea este subiectivă (apreciere vizuală).

2.2.6.0.7. Contraimunelectroforeza (C.I.E.) permite, deasemenea, în 1/2—1 oră recunoaşterea serurilor care conţin antigenul hepatitei virale B, precum şi recunoaşterea antigenului unor anume agenţi patogeni, în L.C.R. sau în urină. Tehnica permite, într-un procent apreciabil de

Scanned with OKEN Scanner

cazuri, punerea unui diagnostic de meningită cu pneumococi, cu neisserii sau cu Hemophilus, chiar în cazuri cînd aceşti germeni nu mai pot fi izolaţi din L.C.R.

2.2.6.0.8. ELISA (Enzym-Labelled-Imuno-Sorbent-Assay). Principiul metodei se bazează pe obţinerea unei reacţii de culoare, care se produce între o enzimă fixată pe un antigen (sau anticorp) şi un substrat pe care enzima îl transformă într-un produs colorat. Reacţia se produce pe o placă de polistiren, pe care aderă un prim strat de anticorpi. Pe aceştia, în funcţie de varianta tehnică, se fixează fie antigenul, fie antigenul şi anticorpul respectiv (reacţie în mai multe straturi, alternînd cu spălări pentru îndepărtarea reactanţilor nefixaţi şi din care unul din reactanţi este legat de o enzimă, care va putea fi evidenţiată printr-o reacţie de culoare). Pregătirea plăcilor este delicată şi migăloasă dar, odată realizată, reacţia decurge repede şi citirea se face uşor. Tehnica este foarte sensibilă şi a fost utilizată în diagnosticul rapid al multor boli bacteriene, virale şi parazitare.

În anumite situaţii, anticorpii marcaţi cu o enzimă pot înlocui avantajos imunfluorescenţa, făcînd citirea mai uşoară la un microscop obişnuit.

2.2.6.0.9 Aglutinări induse şi precipitări în gel. Se fixează în prealabil pe diferite suporturi corpusculare (latex, membrane stabilizate de hematii şi, în ultimul timp, stafilococi cu proteină A) diverşi anticorpi antibacterieni sau antivirali. Aceste suporturi încărcate cu anticorpi, puşi în contact cu un lichid care conţine antigenii respectivi (de ex., L.C.R., lichid pleural, urină, spută etc.) produc rapid o aglutinare vizibilă. Unele din acest fel de analize au putut deveni uşor de executat la patul bolnavului.

Mai citäm, tot sub titlu informativ, că mai sînt o serie de alte analize relativ simple, care se bazează pe o precipitare a complexului antigen-anticorp în gel de agar sau agaroză, dar care cer o incubare de 12—24 de ore. Citäm astfel *dubla difuziune în gel* (Ouchterlony) şi *difuzia radială* (Mancini), care se pot utiliza şi pentru titrarea în serie a unor seruri de la bolnavi, folosind „imunoplăci", care pot fi livrate gata de utilizare de unele întreprinderi *(vezi 2.2.6.0.3.2.)*

★

Clinicienii trebuie să solicite laboratoarelor să se înzestreze, pentru a putea executa aceste tehnici atît de necesare unui diagnostic rapid. Laboratoarele clinice trebuie, la rîndul lor, să înştiinţeze pe clinicienii interesaţi cînd şi pentru ce situaţii ele pot executa urgent aceste tehnici rapide, uneori de mare folos, pentru instituirea neîntîrziată a unor tratamente adecvate.

2.3. UROCULTURA

Obiectiv : diagnosticul infecţiilor urinare şi al unora din cauzele ajutătoare.

2.3.0.0.1. Infecţiile urinare sînt frecvente, des însoţite de fenomene clinice uretrovezicale (disurie, polakiurie, urini tulburi etc.) şi, uneori,

și fenomene generale (febră, alterarea stării generale etc.). Deseori, mai ales la femei, bătrîni și copii, ele sînt *asimptomatice*. Alteori, fenomenele clinice sugestive nu sînt de natură infecțioasă.

În mod normal, urina este sterilă și căile urinare nu conțin germeni; excepție face ultima porțiune a uretrei și, în special, meatul urinar, populate (asimptomatic) de o floră variată, cu aceiași germeni care se găsesc și pe perineu.

Infecțiile urinare sînt deseori *ascendente* (mai ales la femei); uneori, apar spontan sau sînt provocate prin sondaje vezicale. De obicei, sînt produse de flora oportunistă aerobă, de cele mai multe ori unietiologice, mai ales cu E. coli, dar pot fi produse de oricare alți germeni (bacterii, fungi, paraziți), aflați la nivelul perineului sau în regiunea vulvovaginală. În afara germenilor oportuniști, infecțiile ascendente pot fi produse și de germeni specifici (de ex., gonococi).

Infecțiile urinare *hematogene* sînt provocate, de obicei, de germeni patogeni specifici (bacil Koch, leptospire, bacil tific, brucele etc.), dar și de stafilococi, enterococi și alții, în cadrul unei bacteriemii sau septicemii. Deseori, sînt produse de E. coli, mai rar de alți germeni intestinali, în cadrul sindromului enterorenal, la bolnavii cu litiază renală sau cu diferite alte cauze de stază urinară. La bătrîni, la prostatici, la persoane spitalizate de mai mult timp, în special în secțiile de urologie și de terapie intensivă, predomină infecțiile cu piocianic, proteus și alți germeni, polirezistenți la antibioticele uzuale. În general, infecțiile urinare sînt pricinuite de o singură specie microbiană. O floră mixtă indică, de obicei, o contaminare a urinei (recoltare sau păstrare incorecte) sau o infecție vezicală masivă prin sonda lăsată pe loc sau la bolnavii sondați în mod repetat.

Infecțiile urinare sînt des (peste 50%) însoțite de albuminurie și des (50—70%) de leucociturie (peste 300 000 de leucocite/oră). Deseori, se produc modificări de pH, care pot influența eficacitatea tratamentului antimicrobian. Bolnavii cu diabet sînt mai expuși la infecții urinare; în aceste cazuri, tratamentul antidiabetic trece deseori pe primul plan.

Din aceste motive, *examenul de urină* pentru diagnosticul infecțiilor urinare trebuie să cuprindă neapărat 5 *puncte* (rezultatul se trece pe același buletin), și anume: *cercetarea bacteriuriei* (metode directe — urocultura — sau indirecte), *cercetarea albuminuriei* și a *glicozuriei*, *pH-ul* urinar, *examenul sedimentului urinar* (nativ și colorat).

2.3.0.0.2. Recoltarea urinii pentru urocultură. Pentru diagnosticul infecțiilor urinare, recoltarea urinei trebuie să se facă înainte de începerea oricărui tratament antiinfecțios sau după cel puțin 3—5 zile după întreruperea lui. Examenul de urină se mai poate face și în timpul unui tratament, pentru controlul eficacității acestuia. În general, sondajul vezical trebuie evitat, pe cît posibil, deoarece simpla introducere a unei sonde prin uretră antrenează germeni din uretra anterioară în vezică, mijlocind astfel o infecție urinară. Această manoperă este special de periculoasă la bolnavii cu o apărare deficitară, la cei spitalizați de cîtva timp, la care se produce repede o colonizare cu „flora de spital", de obicei rezistentă la antibioticele uzuale.

Scanned with OKEN Scanner

Urina se recoltează de preferință *dimineața* (urina de peste noapte) sau după cel puțin 3—4 ore de la micțiunea precedentă. În timpul recoltării, urina poate fi contaminată sau suprainfectată cu germeni oportuniști din uretra anterioară sau de la nivelul perineului și din regiunea uretrovaginală la femeie. Recoltarea trebuie să evite aceste contaminări și examenul trebuie limitat numai la flora abundentă și net preponderentă (apreciere cantitativă). Pentru minimalizarea erorilor posibile de recoltare și din cauza unor eventuale bacteriurii intermitente, examenele de urină, mai ales la femei, vor fi repetate de 2—4 ori la 24 de ore interval.

Recoltarea se face, de regulă, luînd o probă de minimum 10—25 ml „din zbor", *din mijlocul jetului urinar*, după ce în prealabil s-a făcut o toaletă externă amănunțită.

La femeie, în special, recoltarea necesită o toaletă atentă. Înainte de recoltare, pacientele vor fi bine instruite și eventual asistate de un personal competent. Pentru ca recoltarea să decurgă corect, sînt necesare : 4—5 tampoane sterile, apă fiartă și răcită (de ex., într-un ceainic), săpun, un borcan steril de 200—300 ml cu gura lată și capac metalic (de ex., un borcan de miere sau de compot sau dulceață, cu capacul întredeschis, pentru a fi mai ușor de manipulat cu o singură mînă), un vas oarecare (sau W.C.), în care va curge urina înainte și după recoltare. După ce își spală cu apă și săpun mîinile, pacienta se așază comod, cu picioarele despărțite ; cu degetele mîinii stîngi, se îndepărtează bine labiile vulvare, care sînt menținute astfel în tot timpul toaletei și recoltării. Cu mîna dreaptă, plasează apoi superficial în vagin un tampon steril, pentru a evita ca urina să fie contaminată de o scurgere vaginală, dacă este cazul. În continuare, cu un alt tampon, udat cu apa fiartă și răcită, va săpuni bine vulva, din față către spate, în special în dreptul meatului urinar ; operația se repetă, eventual de 2 ori, de fiecare dată cu un tampon nou. În fine, cu alte 2—3 tampoane sterile își spală foarte atent regiunea respectivă, tot din față către spate, cu apă fiartă și răcită, pentru a îndepărta toate resturile de săpun.

Numai după această toaletă, va urina, lăsînd să curgă (într-un vas oarecare sau în W.C.) aprox. primii 50—100 ml de urină, iar apoi va recolta „din zbor", în borcanul steril o cantitate de 25—100 ml de urină. Buza borcanului sau partea interioară a capacului nu trebuie să se atingă cu mîna sau cu o parte a corpului. În continuare, restul de urină va fi eliminat într-un vas oarecare sau în W.C.

La bărbat, recoltarea este mai simplă, dar se iau de asemenea toate precauțiile, pentru ca urina să nu fie contaminată cu germeni oportuniști de pe tegumentele și mucoasele învecinate. Dacă bolnavul are o scurgere uretrală se fac recoltări, frotiuri (și culturi) din secreție (gonococii pot fi văzuți, deseori, pe preparatele colorate cu albastru de metilen și Gram, dar *nu* cresc pe mediile uzuale).

La persoanele imobilizate la pat, care nu pot coopera, ca și *la copiii mici*, recoltarea este mai dificilă și trebuie executată de un personal competent și rutinat, care după ce face o toaletă amănunțită a regiunii, va fixa (eventual cu bandă adezivă) un flacon steril în dreptul meatului

Scanned with OKEN Scanner

urinar şi va pîndi recoltarea urinei, pentru a o trimite neîntîrziat la laborator.

La persoanele cu o sondă vezicală permanentă, urina se recoltează cu seringa, puncţionînd steril sonda în apropierea meatului urinar ; în nici un caz, nu se recoltează din punga colectoare. În anumite cazuri de excepţie, se poate obţine urina prin puncţie suprapubiană. Dacă nu este posibil altfel, urina se poate recolta prin sondaj vezical, după o toaletă riguroasă a regiunii (vezi mai sus). În acest caz, după recoltarea prin sondaj şi golirea vezicii, se introduc acolo 10—20 ml dintr-o soluţie antiseptică, de ex. soluţie de clorhexidină (Hibitane), 1 ml din soluţia mamă (20%) la 1 000 ml de apă. În lipsă, se poate introduce 10—20 ml dintr-o soluţie 1% de antibiotic de tipul aminoglicozidelor.

După recoltare, se pune capacul pe borcan, se etichetează borcanul, care apoi va fi dus imediat (cald) la laborator, pentru ca urina să fie examinată în primele 30 de minute de la recoltare. Dacă aceasta nu este posibil, urina trebuie plasată imediat la frigider, urmînd să fie examinată în orele următoare. Mersul operaţiilor este indicat în fig. 34.

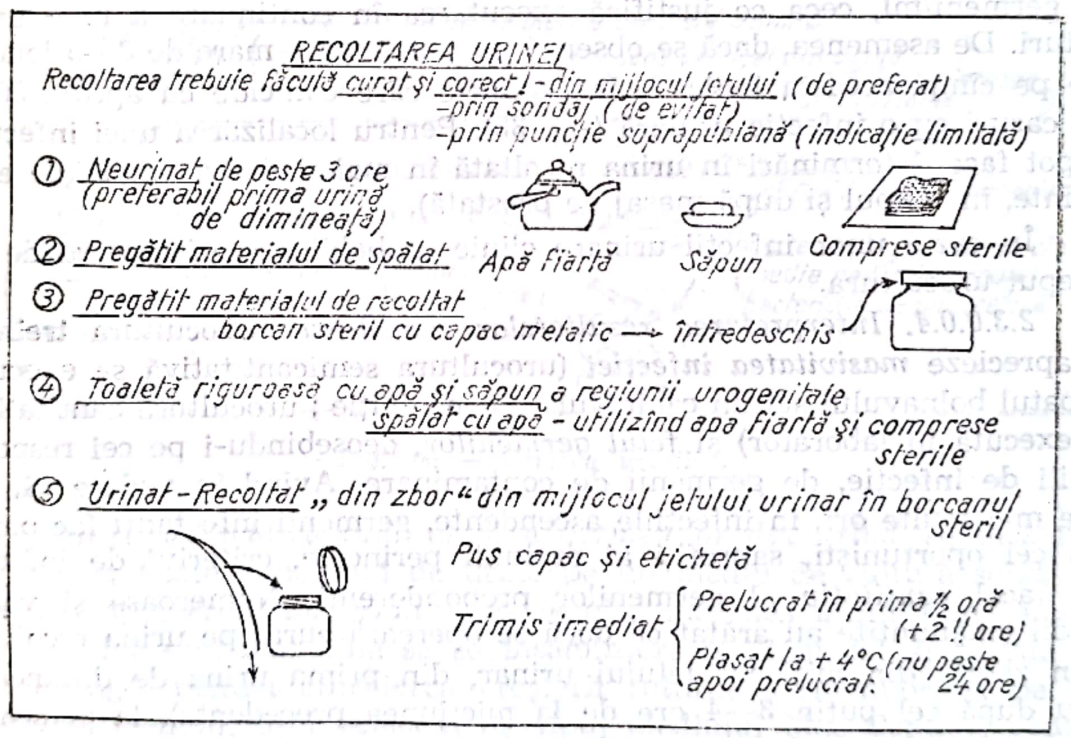


Fig. 34. — Recoltarea urinei.

2.3.0.0.3. Trierea prealabilă a urinilor, în vederea depistării unor infecţii urinare. În afara criteriilor clinice, are importanţă — în primul rînd — aspectul macroscopic al urinei proaspăt emise, care în mod normal trebuie să fie perfect limpede şi cu un luciu caracteristic.

Pentru trierea rapidă a cazurilor cu infecţii urinare asimptomatice (1—5% la fetiţe şi 5—10% la femei), se pot folosi *teste simple şi rapide,* şi anume : testul Gries al nitriţilor, testul catalazelor, testul cu trifenil-tetrazoliumclorid (TTC), al glicozuriei minimale, pentru care s-au ima-

ginat hîrtii reactiv speciale. Toate acestea însă nu dau decît 50—80% rezultate exacte sau echivoce ; din această cauză, sînt socotite nesatisfăcătoare şi se preferă bacterioscopia sau urocultura semicantitativă. De notat că examenul microscopic al sedimentului urinar, dacă arată o leucociturie şi cilindrurie cu cilindri leucocitari, diagnosticul infecţiei urinare superioare devine sigur.

S-a mai recomandat, de unii autori, amestecarea urinei, fără a produce spumă, apoi recoltarea cu ajutorul unei anse calibrate cu 5 mm ∅ interior, care se introduce vertical în urină, a unei picături de urină, care se depune pe o lamă portobiect fără a o întinde. Picătura se acoperă cu o lamelă şi se examinează la microscop cu imersie (de notat că uleiul de cedru trebuie să fie destul de fluid, pentru a nu antrena lamela lipită de obiectiv în timpul examinării). Se mai pot întinde picături de urină pe o arie de 5 mm ∅, se lasă să se usuce şi se colorează cu Gram. Se examinează 10 cîmpuri microscopice. Dacă se observă o singură bacterie (în medie) pe cîmp microscopic, aceasta indică o bacteriurie de aprox. 10^5 germeni/ml, ceea ce justifică executarea în continuare a unei uroculturi. De asemenea, dacă se observă un număr mai mare de 3—5 leucocite pe cîmp, aceasta indică o leucociturie care coincide cu aprox. 50% din cazuri cu o infecţie urinară (fig. 35). Pentru localizarea unei infecţii, se pot face determinări în urina recoltată în mai multe porţiuni (de ex., înainte, în timpul şi după masaj de prostată).

În cazul unor infecţii urinare clinic probabile, se efectuează de la început urocultura.

2.3.0.0.4. Interpretarea rezultatelor uroculturii. Urocultura trebuie să aprecieze *masivitatea infecţiei* (urocultura semicantitativă se execută la patul bolnavului sau în cabinetul de consultaţie ; urocultura cantitativă se execută în laborator) şi *felul germenilor*, deosebindu-i pe cei responsabili de infecţie, de germenii de contaminare. Avînd în vedere că, de cele mai multe ori, în infecţiile ascendente, germenii infectanţi fac parte din cei oportunişti, saprofiţi ai regiunii perineale, criteriul de infecţie este acel *cantitativ* al germenilor preponderenţi. Numeroase şi vaste studii amănunţite au arătat că dacă se operează curat pe urina recoltată „din zbor", din mijlocul jetului urinar, din prima urină de dimineaţă (sau după cel puţin 3—4 ore de la micţiunea precedentă), la persoane care nu au luat substanţe antibacteriene sau au întrerupt acest tratament de peste 3—5 zile, se poate aprecia ca fiind o *bacteriurie semnificativă* de infecţie urinară, dacă pe ml de urină se constată peste 10^5 bacterii oportuniste sau $0{,}5 \times 10^5$ stafilococi, sau 10^3 candide, sau încă mult mai puţin, dacă este vorba de germeni patogeni (bacil Koch, leptospire, bacil tific etc.). Unii germeni se văd la microscop, dar nu cresc pe medii uzuale (de ex., gonococii).

La persoane cu capacitate vezicală mică, la care intervalele dintre micţiuni sînt scurte, trebuie coborîte cifrele indicate mai sus de 5 sau chiar de 10 ori.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă se recoltează urina prin puncție suprapubiană, indiferent de numărul de germeni găsiți, se poate socoti că este vorba de o infecție urinară (exceptînd foarte rarele cazuri de contaminare cu Staphylococus epidermidis).

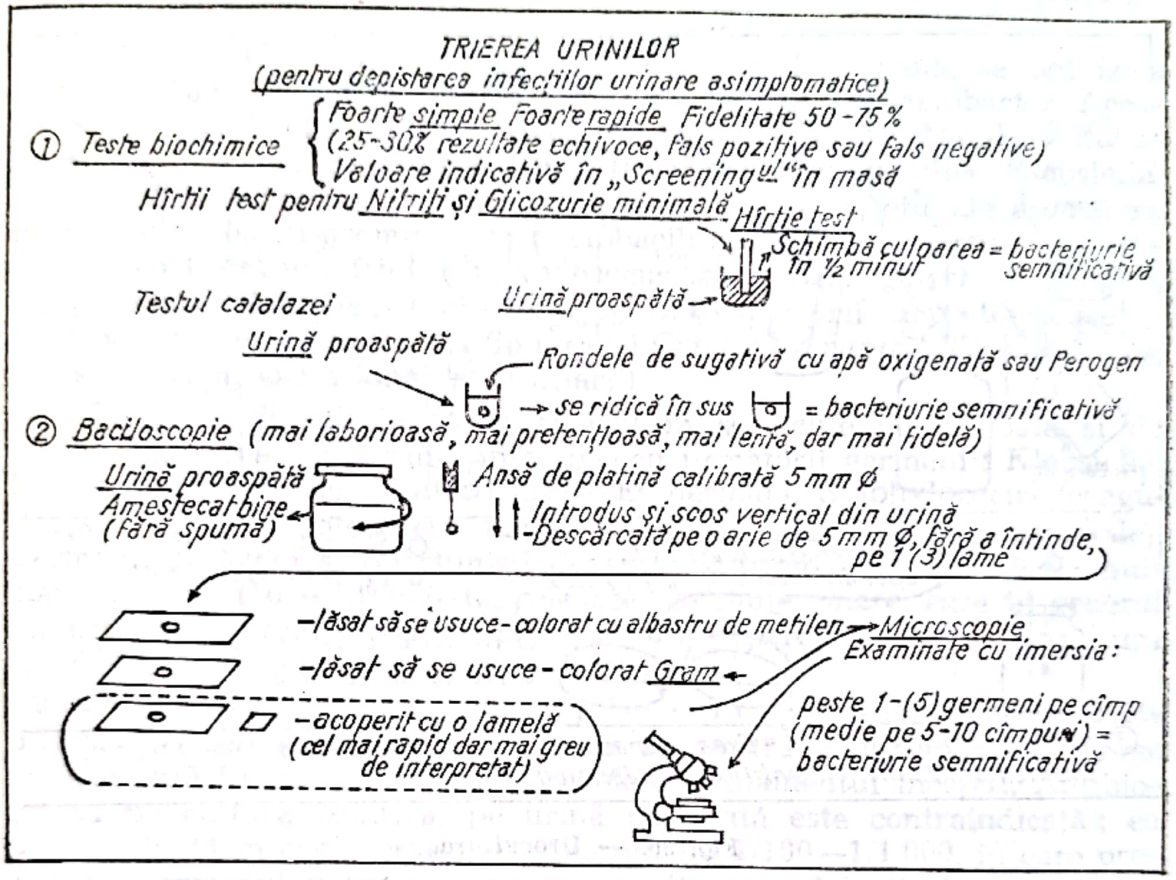


Fig. 35. — Trierea urinilor.

Pentru *aprecierea cantitativă a germenilor din urină*, se însămînțează o cantitate cunoscută de urină pe un mediu de cultură solid. Pe geloza simplă cresc majoritatea germenilor mai des întîlniți în infecții urinare, dar este mai bine să se însămînțeze pe 2 medii, și anume pe geloză-sînge, pentru aprecierea creșterii tuturor germenilor, și pe un mediu diferențial, ușor selectiv, de tipul mediului Mac Conkey, pentru germeni intestinali.

Metoda cea mai simplă care poate fi aplicată de orice soră la orice oră : se preling *cîteva picături de urină pe suprafața gelozei* menținută aproape vertical, sau se cufundă *lama acoperită cu geloză în urină* și se scoate imediat (tip Uricult). Se va lăsa un colț al gelozei neudat de urină, care va servi pentru recunoașterea (prin contrast) a unei creșteri bacteriene în pînză subțire. După o incubare de 18—24 de ore la 35°, sau chiar la nevoie la temperatura camerei la care cresc mai toți oportuniștii, enterobacteriile, dar nu enterococii, se apreciază bogăția cultu-

rilor prin compararea cu o scară de figuri (colonii separate ; dese, dar nu confluente ; confluente) (fig. 36).

Ceva mai precisă este *metoda anselor calibrate*, care introduse vertical în urina amestecată în prealabil (fără spumă), recoltează o cantitate fixă de urină (ansa de 5 mm ∅ interior recoltează aprox. 0,01 ml ;

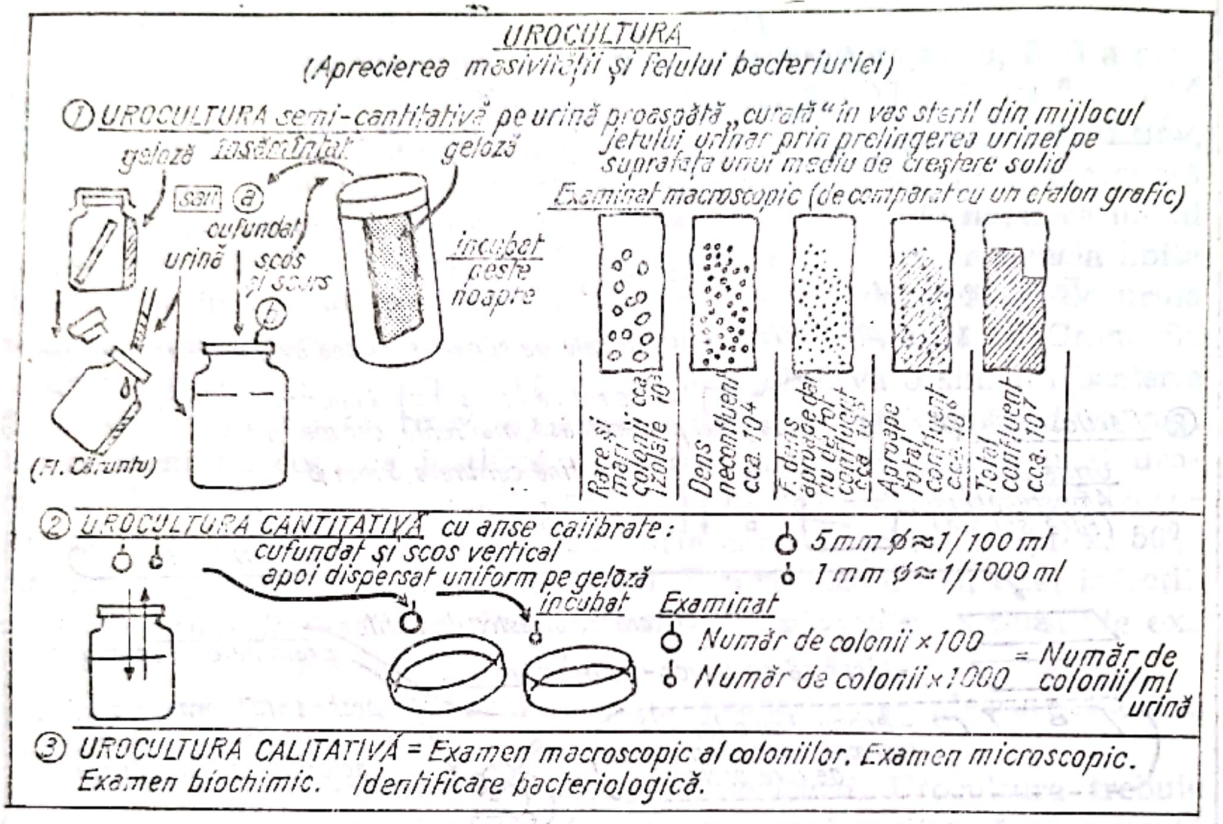


Fig. 36. — Urocultura.

ansa de 1 mm ∅ interior, recoltează aprox. 0,001 ml), care este apoi dispersată pe suprafața unui mediu solid (într-o cutie Petri, se poate face pe fiecare jumătate, dispersarea celor 2 anse). După o incubație ca mai sus, se numără coloniile. Fiecare colonie în cazul ansei mari reprezintă 100 germeni/ml ; în cazul ansei mici, reprezintă 1 000 germeni/ml (ansa de nichelină se alterează destul de repede și zgîrie ușor mediul, așa încît se recomandă să se utilizeze anse de platină).

Mai precisă este *metoda de a amesteca 0,1 ml urină cu 10 ml apă distilată sterilă* (diluție 1/100) ; se preia 0,1 ml care se răspîndește uniform pe suprafața unei geloze. Fiecare colonie apărută după incubație, reprezintă 10^3 bacterii pe ml ; sub 10 colonii reprezintă sub 10^4 colonii/ml, ceea ce se socotește a fi o bacteriurie nesemnificativă ; iar > 10--100 colonii reprezintă 10^4—10^5 colonii/ml, ceea ce se interpretează ca un rezultat îndoielnic, iar peste 100 și mai ales peste 1 000 colonii (10^5—10^6 colonii/ml) ar fi o bacteriurie semnificativă.

Încorporarea a 0,1 ml din urina diluată 1/10, 1/100 și 1/1 000 în geloză topită și răcită la 50° și turnarea imediată în cutii Petri este mai precisă, dar mai laborioasă și nu prezintă mari avantaje practice.

Scanned with OKEN Scanner

2.3.0.0.5. Urocultura în situaţii speciale este executată, de obicei, de medicul specialist de microbiologie clinică, folosind medii speciale şi condiţii speciale de incubare pentru anumiţi germeni (bacili tifici, brucele, gonococi, leptospire, bacil Koch). Identificarea diferiţilor germeni aflaţi în urină se face în laboratorul de microbiologie de către un personal competent.

2.3.0.0.6. Germeni izolaţi prin urocultură. Din urină, se pot izola următorii *bacili gramnegativi* (în ordine alfabetică) : Acinetobacter, Acromobacter, Aerobacter, Alcaligenes, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia (în special *E. coli*, cu mult cel mai frecvent), Haemophilus, Klebsiella, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Salamonella spp., etc. De asemenea, se pot izola : *bacili grampozitivi* (lactobacili şi Bacillus sp., bacili difteromorfi), *coci grampozitivi* (Staphylococus coagulazonegativi şi pozitivi, Streptococcus faecalis), *coci gramnegativi* (neisserii nepretenţioase şi gonococi), *micobacterii, levuri* (în special Candida) ; *paraziţi* (Trichomonas, Schistosoma şi, excepţional, microfilarii).

La bolnavii spitalizaţi, în special în serviciile de urologie şi de terapie intensivă, predomină infecţiile cu următorii germeni : Klebsiella, Pseudomonas, Proteus, Enterobacter, Escherichia, Staphylococus (coagulazopozitiv) şi Streptococcus faecalis (rezistenţi la antibioticele uzuale). Germenii patogeni şi oportunişti deveniţi patogeni sînt, de obicei, mult mai numeroşi (10^5—10^6/ml), faţă de acei de contaminare, care în general nu depăşesc 10^3/ml, ceea ce permite diferenţierea lor prin urocultura cantitativă.

Antibiograma (vezi şi cap. *4.3.*). Deseori este inutilă, deoarece multe infecţii urinare acute cedează repede la un tratament raţional. Ea se impune însă în infecţii severe şi rebele la tratamentul început. Antibiograma pe cultură primară, pe urină nediluată este contraindicată ; ea poate fi luată în considerare pe urina diluată 1/100—1/1 000, în care predomină germenul patogen, ceea ce permite uneori instituirea unui tratament mai precoce, în anumite cazuri grave. De cele mai multe ori, se face antibiograma pe culturi secundare faţă de germenul patogen.

2.3.0.0.7. Alte determinări, utile în diagnosticul infecţiilor urinare :

2.3.0.0.7.1. Determinarea pH-ului urinar se face cu hîrtie indicator universal. Normal, pH-ul este în jurul valorii de 6 (4,8—7,4). Urinile alcaline sugerează, deseori, o infecţie urinară cu germeni intestinali, mai ales cu Proteus sp. ; urinile acide, cu piurie şi fără germeni vizibili la coloraţia Gram, sugerează o tuberculoză renală. Acţiunea metenaminei, a acidului nalidixic şi a nitrofurantoinei este mult întărită la un pH de 5—5,5, a penicilinei la un pH de 6, iar a aminoglicozidelor la un pH de 7,5—8.

2.3.0.0.7.2. Determinarea albuminuriei şi a *glicozuriei*, eventual, şi a *acetonuriei* (uneori, şi a *hemoglobinuriei*, mai ales la bolnavi care au locuit în ţări calde) se face folosind teste rapide cu hîrtii-reactivi şi cu pulberi reactive ale laboratorului galenic din Oficiul Farmaceutic nr. 1 Bucureşti, care livrează reactivi împreună cu modul de utilizare şi scară etalon, pentru o apreciere semicantitativă. În lipsa testelor rapide, se pot

Scanned with OKEN Scanner

folosi tehnicile clasice (albuminuria cu acid sulfosalicilic și glicozuria cu reactivul Benedict) (fig. 37).

Determinarea pH-ului urinar și analizele biochimice de mai sus pot fi făcute în timp ce s-a pus urina la centrifugare pentru sedimentul urinar.

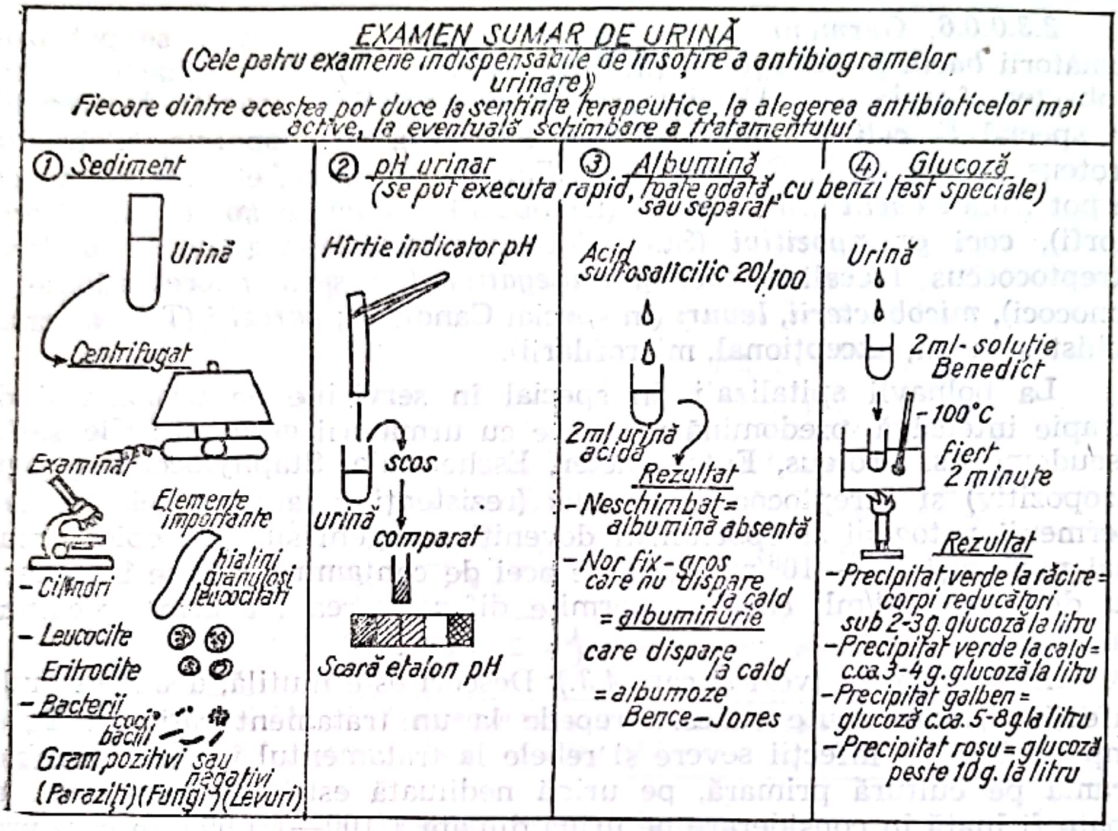


Fig. 37. — Examenul sumar de urină.

2.3.0.0.7.3. Sedimentul urinar. Se pun 5—8 ml de urină într-un *tub de centrifugă perfect curat* (și steril). Perfecta curățenie este indispensabilă, deoarece în fundul tuburilor de centrifugă, folosite de mai multe ori, se pot găsi germeni, care (deși omorîți la sterilizare) rămîn vizibili la examenul microscopic, putînd constitui o gravă sursă de erori atît în privința germenilor grampozitivi și gramnegativi, cît și a germenilor acidoalcoolorezistenți, proveniți eventual de la robinetele de apă caldă.

După 10 minute de *centrifugare la 1 000—2 000 turații/minut*, se scurge brusc supranatantul și, după o omogenizare prin agitare ușoară, se examinează la microscop *sedimentul între lamă și lamelă.*

Pentru cercetarea bacililor acidoalcoolorezistenți, se va centrifuga un volum mai mare de urină proaspătă, timp mai îndelungat și la o turație mai mare. Pe lîngă preparatul proaspăt, se fac întotdeuna 4 *frotiuri,* care vor fi colorate astfel : unul cu albastru de metilen, altul cu Gram, altul (eventual) cu Ziehl ; ultimul este păstrat ca rezervă. Preparatele sînt examinate cu mărire mică, medie și apoi cu obiectivul de imersie, pentru studiul caracterelor morfotinctoriale ale celulelor, cilin-

drilor şi germenilor aflaţi în urină. Acest examen permite decelarea rapidă calitativă şi semicantitativă a unor germeni, al căror aspect poate orienta un tratament raţional, evidenţiind eventual gonococi şi baţili Koch, a căror cultivare este dificilă şi durează mult.

Dintre diferitele *elemente şi formaţiuni vizibile în sediment* (celule din căile urinare inferioare şi superioare, leucocite, hematii, cilindri de diferite feluri, cristale şi săruri de diferite feluri, precum şi germeni) cele mai importante, din punct de vedere al infecţiilor urinare, îl constituie *germenii* (de obicei bacili mobili, mai rar coci, levuri şi paraziţi). De asemenea, are mare însemnătate evidenţierea unui număr mare de *leucocite,* în special alterate, a unor *cilindri leucocitari,* care indică o pielonefrită, şi eventual a hematiilor.

La prematuri, nou-născuţi, imunodeprimaţi, bolnavi cu transplant renal, se pot evidenţia uneori, în sedimentul colorat cu Giemsa, unele celule cu incluziuni intranucleare, mari, înconjurate de o zonă clară („în ochi de păun sau de bufniţă"), produse de virusul citomegalic.

2.3.0.0.8. Rezultatul uroculturii. Considerăm insuficientă o simplă raportare „peste" sau „sub" 100 000 (10^5) germeni/ml, fără a indica ordinea de mărime a infecţiei. Aceasta este necesar pentru aprecierea ulterioară a evoluţiei spontane sau sub tratament a infecţiei.

Bineînţeles, o bacteriurie poate fi considerată semnificativă sau nesemnificativă, numai dacă s-au respectat întocmai condiţiile de recoltare, conservare, prelucrare şi interpretare, semnalate mai sus, şi mai ales dacă a fost repetată de mai multe ori.

2.4. LICHIDUL CEFALORAHIDIAN (L.C.R.)

Obiectiv : diagnosticul meningitelor, al etiologiei lor şi, uneori, al cauzelor neinfecţioase, care pot determina un sindrom meningian.

Diagnosticul şi tratamentul meningitelor constituie una din *cele mai mari urgenţe medicale.* Meningitele bacteriene, fungice şi parazitare netratate la timp, în mod corect, sînt de obicei mortale. Medicul, care suspectează o meningită, trebuie neîntîrziat, la orice oră din zi şi din noapte, să poată asigura un diagnostic corect, pentru instituirea grabnică a unui tratament raţional, eventual etiotrop.

2.4.0.0.1. Sindromul meningian (cefalee, fotofobie, vărsături, redoare de ceafă, bombarea fontanelei la copilul mic, semnul Kernig, Brudzinski, semnul trepiedului etc.), mai ales dacă este însoţit de febră, fenomene generale, manifestări encefalitice difuze, uneori atingeri de nervi cranieni, convulsii, comă, este de regulă datorat unei infecţii a meningelor (meningite).

În unele infecţii meningiene, în special *la sugar,* dar uneori şi la bătrîni, meningitele au *o simptomatologie frustă şi înşelătoare.* La sugarul deshidratat, bombarea fontanelei poate lipsi şi meningita se manifestă doar prin febră, alterarea stării generale, inapetenţă, nelinişte, iritabili-

Scanned with OKEN Scanner

tate, somnolență, mișcări dezordonate ale mîinilor la cap, eventual convulsii.

Infecțiile meningiene pot fi provocate de o mare varietate de *agenți bacterieni* (neisserii, piogeni, streptococi, pneumococi, hemofili, stafilococi, colibacili, proteus, klebsiele, salmonele, piocianic, listerii, bacili Koch, spirochete, leptospire), de *virusuri* (enterovirusuri, urlian, herpes simplex, varicelozosterian, coriomeningitic etc.), de *fungi* (candide, criptococus etc.), de *paraziți* (Hartmanella, Naegleria, Toxoplasma, tripanosoma, trichinela etc.).

Sindromul meningian poate să apară, în afara unei infecții meningiene patente, întovărășind o infecție generală sau o boală, ca în febra tifoidă, tifos exantematic, mononucleoză infecțioasă, pneumonie, malarie, ascaridoză (mai ales la copil), în traumatisme etc. Sindromul meningian poate să apară în tumori și în abcese cerebrale, în infecții de vecinătate (sinuzite, mastoidite etc.), în afecțiuni reumatismale, în spondilite, în colagenoze, în afecțiuni alergice, postvaccinal, în insolații, stări hipertermice, deshidratări mari, uremie, intoxicații (alcoolice și altele), hemoragii subarahnoidiene, în tromboflebite cerebrale și în multe alte situații.

Orice bănuială de meningită *impune de urgență un examen al lichidului cefalorahidian.* Mai bine se face o puncție rahidiană inutilă, decît să se treacă pe lîngă o meningită ignorată. Avînd în vedere însă că puncția rahidiană poate fi periculoasă (mai ales dacă se scoate mult L.C.R.), în stări cu hipertensiune intracraniană, în sindroame înlocuitoare de spațiu cerebral, unde se pot produce mai curînd sau mai tîrziu după puncție angajări bulbare în canalul rahidian, este necesar (mai ales la adult) ca puncția rahidiană să fie precedată de un examen amănunțit, inclusiv un examen de fund de ochi.

Examenul cuprinde date epidemiologice, anamnestice, istoricul amănunțit cu modul de debut și evoluția simptomelor, examenul clinic complet, precum și unele investigații de laborator, ca : numărătoarea și formula leucocitară, viteza de sedimentare a eritrocitelor, picătura groasă (în caz de suspiciune de malarie sau de febră recurentă) și hemocultura. Aceste examene pot, de multe ori, să sugereze sau chiar să asigure diagnosticul etiologic și să respingă diferite etiologii, indicînd sau excluzînd anumite examene ulterioare. Nu este posibil și nici de dorit să se facă întotdeauna toate examenele de L.C.R. posibile și, din această cauză, medicul trebuie să se conducă, conform mersului logic al suspiciunilor și al etapelor de investigații.

2.4.0.0.2. Puncția rahidiană. Aceasta trebuie făcută, pe cît posibil, înainte ca bolnavul să fi luat antibiotice sau chimioterapice. Într-o suspiciune de meningită, la bolnavii cu un sindrom meningian, puncția rahidiană se face preferabil în regiunea lombară, bolnavul fiind așezat în decubit lateral. Dacă bolnavul este agitat, se poate administra în prealabil un sedativ. La nevoie, bolnavul este imobilizat, legîndu-l cu un cearșaf făcut funie și trecut după ceafă și genunchi, strîns bine cît se poate și înnodînd apoi capetele.

Scanned with OKEN Scanner

2.4.0.0.2.1. Puncţia lombară se face la locul de elecţie, între a 4-a şi a 5-a vertebră lombară. Dacă nu se poate, se face mai sus, sau se recurge eventual la puncţia suboccipitală (fig. 38).

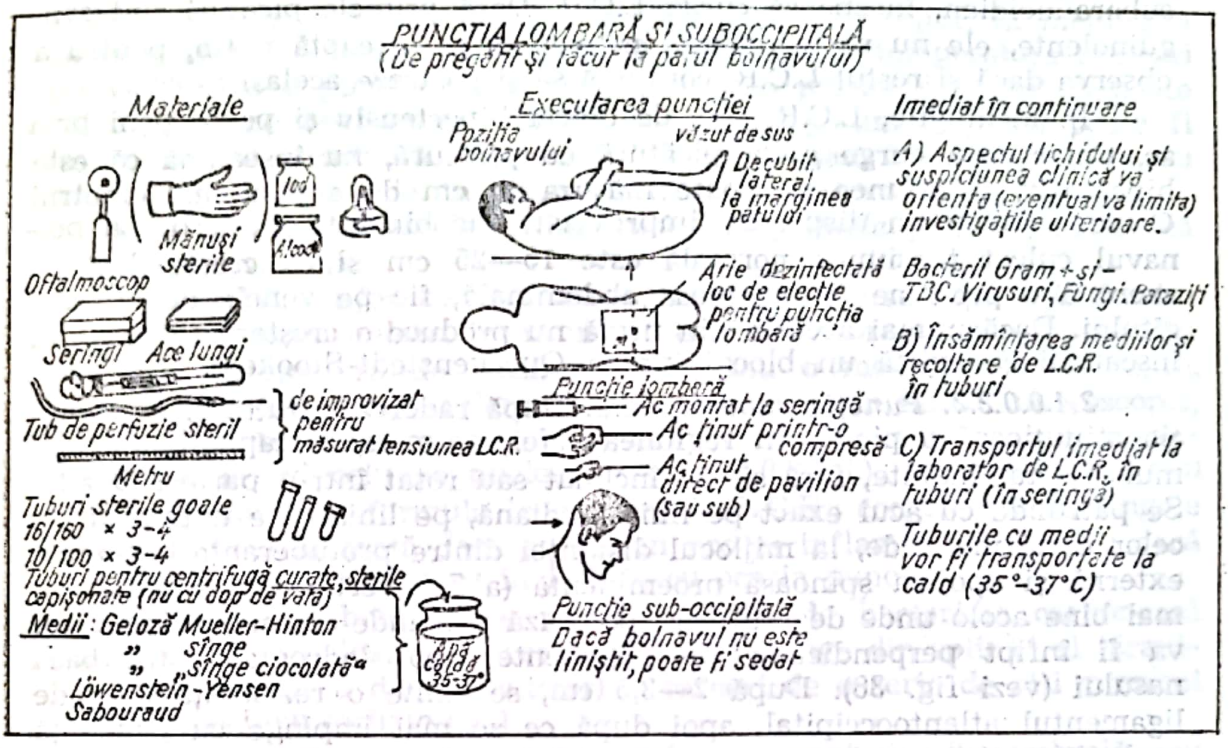


Fig. 38. — Puncţia lombară şi puncţia suboccipitală.

Puncţia rahidiană trebuie efectuată cu respectarea celor mai stricte reguli de asepsie. Se preferă *ace speciale pentru puncţii rahidiene.* În lipsa lor, se folosesc ace sterile de oţel inoxidabil (nu de nichel şi nici prea subţiri, deoarece se îndoaie prea uşor), cu bizoul scurt şi bine ascuţit, prevăzute cu un mandren, care la un capăt să nu depăşească vîrful acului şi la celălalt capăt să fie îndoit în dreptul pavilionului. Acele trebuie să fie de 8—10 cm, pentru puncţia lombară la adult, şi de 6—7 cm, pentru copil şi pentru puncţii suboccipitale.

Pielea bolnavului se dezinfectează bine prin frecare cu alcool şi apoi cu tinctură de iod, pe o suprafaţă pătrată cu latura de cel puţin 20 cm. Medicul se spală bine pe mîini şi apoi îşi pune mănuşi sterile sau îşi dezinfectează degetele de la ambele mîini cu tinctură de iod. După aprox. 2 minute, timp necesar acţiunii de dezinfecţie, se poate face puncţia. Se introduce mandrenul în ac în mod steril, se apucă acul de pavilion, eventual prin intermediul unei comprese sterile sau se face puncţia cu acul montat la o seringă de 2 ml, tip Luer (mai uşoară şi mai comod de manipulat). Se mai poate face puncţia direct cu acul apucat de pavilion, prin intermediul unei comprese, dar nu direct cu degetele dezinfectate cu tinctură de iod, deoarece aceasta ar putea veni în contact cu L.C.R. şi ar putea compromite cultivabilitatea eventualilor germeni.

Apucarea acului de sub pavilion și flambarea pavilionului, cînd începe să se scurgă L.C.R., nu este întotdeauna posibilă și nici întotdeauna eficace, ca măsură de asepsie (fig. 38). Cînd acul pătrunde în spațiul subarahnoidian, începe să curgă L.C.R. Dacă primele picături sînt sanguinolente, ele nu se recoltează imediat, ci se așteaptă puțin, pentru a observa dacă și restul L.C.R. continuă să-și păstreze același aspect.

În meningite, L.C.R. este de obicei hipertensiv și poate țîșni prin ac. Chiar dacă curge greu, picătură cu picătură, nu înseamnă că este hipotensiv. Tensiunea se poate măsura în cm de apă cu manometrul Claude sau cu un dispozitiv improvizat, dar bineînțeles steril. La bolnavul culcat tensiunea normală este 15—25 cm și ea crește dacă se exercită o presiune fie pe masa abdominală, fie pe venele de la baza gîtului. Dacă numai aceasta din urmă nu produce o creștere a tensiunii, înseamnă că există un blocaj (proba Queckenstedt-Stookey).

2.4.0.0.2.2. Puncția suboccipitală. După raderea părului și dezinfecția minuțioasă a pielii din regiunea cefei, se menține capul bolnavului mult flectat înainte, fără să fie înclinat sau rotat într-o parte sau alta. Se pătrunde cu acul exact pe linia mediană, pe linia care unește vîrful celor două mastoide, la mijlocul distanței dintre protuberanța occipitală externă și apofiza spinoasă proeminentă (a 7-a vertebră cervicală) sau mai bine acolo unde degetul care palpează pătrunde cel mai adînc. Acul va fi înfipt perpendicular pe tegumente, apoi îndreptat către baza nasului (vezi fig. 38). După 2—3,5 cm, se simte o rezistență dată de ligamentul atlantooccipital, apoi după ce se mai împinge cu prudență acul cîțiva milimetri, se simte că vîrful acului se află într-un spațiu liber (în cisterna mare). Este bine ca puncția să se facă cu acul montat la o seringă, cu care se aspiră L.C.R., deoarece presiunea lui la acest nivel poate fi aproape de zero.

Odată pătruns în spațiul subarahnoidian și după ce s-au extras primele picături de L.C.R., se flambează pavilionul acului, dacă puncția nu s-a făcut cu acul montat la o seringă, și se recoltează strict steril L.C.R. pentru examene culturale.

2.4.0.0.3. Aspectul L.C.R. Dacă L.C.R. este *tulbure* sau *purulent* sau dacă sînt suspiciuni importante de meningită tuberculoasă, se scot 10—15 ml, la adult, și 2—10 ml, la copil (în funcție de vîrstă). Dacă L.C.R. este limpede, hipertensiv și mai ales dacă există suspiciunea de un sindrom înlocuitor de spațiu cerebral sugerat și prin examenul de fund de ochi, sau dacă L.C.R. este sigur hipotensiv, se scot numai 3—5 ml, calitate suficientă pentru principalele analize care se impun.

Se recoltează L.C.R. în 2—3 tuburi, dintre care unul de centrifugă perfect curat și steril, toate cu capușon de hîrtie (nu dopuri de vată). Se apreciază, mai întîi aspectul macroscopic și apoi se fac celelalte analize necesare.

Aspectul L.C.R. dă, chiar din cursul puncției și al recoltării, o primă și adesea prețioasă indicație privind atît etiologia posibilă, cît și terapia rațională de aplicat de urgență. Se apreciază întotdeauna separat, transparența și culoarea L.C.R.

Scanned with OKEN Scanner

Un *L.C.R. incolor și limpede* (ca „apa de stîncă" sau „ca lacrima") poate fi : L.C.R. normal ; L.C.R. de meningism ; *meningită tuberculoasă ;* meningită seroasă virală (atenție la poliomielită) ; meningită leptospirozică ; rareori și trecător, meningită bacteriană la început. În meningita tuberculoasă, L.C.R. face deseori după cîteva ore la temperatura camerei un văl fin ca o pînză de păianjen, care la o privire superficială poate chiar să scape neobservat. Un L.C.R. incolor și limpede mai poate fi întîlnit într-o encefalită sau o encefalomielită sau, la bolnavii care au trăit în unele țări calde, în malarie sau în tripanosomiază.

Un *L.C.R. sanguinolent,* dar *numai la primele picături,* indică că s-a lezat un vas mic.

Un *L.C.R. uniform sanguinolent,* cu sînge care se depune în fundul tubului *fără să coaguleze,* înseamnă că este o hemoragie meningiană sau cerebrală, o fractură de baza craniului sau o meningită hemoragică. Dacă L.C.R. este sanguinolent macroscopic și chiar numai microscopic, se face numărătoarea elementelor fără și cu acid acetic, care lizează hematiile, lăsînd celulele nucleate (vezi *2.4.0.0.5.3.*), făcîndu-se raportul hematii/leucocite și formula leucocitară în L.C.R., comparativ cu sîngele periferic. Acestea arată dacă există un proces inflamator local sau dacă este sînge periferic pătruns în L.C.R., cu ocazia punctției.

Meningitele hemoragice pot fi produse de bacteridia carbonoasă (sînge închis la culoare și oarecum lipicios ; „sînge din splină" al țăranilor familiarizați cu dalacul vitelor) și rareori de o serie de alți germeni (meningococi, spirochete etc.).

Un *L.C.R. xantocromic* indică o sîngerare anterioară, cerebrală, sau meningiană, o tromboflebită cerebrală (uneori rozat), sau mai rar o meningită tuberculoasă. La bolnavii cu icter, culoarea L.C.R. este galbenă sau galben-verzuie.

Un *L.C.R. opalescent* este datorat de obicei prezenței mai multor sute sau 1—(2) mii de elemente/mm^3. Acest aspect apare în meningitele seroase virale (atenție la poliomielită), uneori în leptospiroze și, rareori, în procese neoplazice invadante sau în meningita bacteriană incipientă. Cînd este opalescent, L.C.R. poate face un văl floconos, care deseori se disociază la agitare puternică, diferit de vălul foarte fin din meningita tuberculoasă.

Uneori, L.C.R. poate fi *opalescent fără pleiocitoză* dar cu opalescența datorată numărului imens de bacterii (de ex., meningită foarte severă cu pneumococi la început).

Un *L.C.R. tulbure* sau *purulent* apare în meningitele bacteriene (meningococice, pneumococice, stafilococice, cu hemofili, cu bacili gram-negativi etc.). Foarte rar, un L.C.R. tulbure poate fi produs de un proces neoplazic sau, și mai rar, de deschiderea în spațiul subarahnoidian a unui abces osifluent tuberculos din morbul Pott. Rareori, tulburarea nu este datorată prezenței de mii de leucocite, ci prezenței unui număr foarte mare de bacterii (de obicei, pneumococi), cu relativ puține leucocite.

Uneori, L.C.R. este *purulent, dar nu se pot evidenția bacterii,* fie că nu au fost suficient căutate, fie că germenii sînt prea rari, sau că s-au autolizat, fie că bolnavul a fost deja tratat cu un antibiotic sau chimioterapic activ pe germenul în cauză. Rareori, poate fi vorba de un abces

Scanned with OKEN Scanner

rece tuberculos, osifluent în morbul Pott, care s-a deschis în spațiul subarahnoidian. În acest caz, coloratia Ziehl poate decela bacili acido-alcoolorezistenți.

În aceste cazuri, se recomandă să se cerceteze de urgență, dacă se poate evidenția în L.C.R. antigen de pneumococi, de meningococi sau de hemophili, prin *contraimunelectroforeză* (vezi *2.2.6.0.7.),* care poate da într-un procent acceptabil de cazuri, în cca 1/2 oră, un rezultat pozitiv. Aceasta însă, bineînțeles, dacă laboratorul este înzestrat cu instalația și ingredientele necesare.

Un *L.C.R. purulent-hemoragic,* de culoare închisă, apare în meningitele amibiene (foarte rare).

Excepțional, la bolnavii cu meningită purulentă cu un sindrom infecțios generalizat și cu stare generală foarte gravă, este necesar să se introducă un *antibiotic intrarahidian,* chiar înainte de a avea rezultatul analizelor de laborator. În aceste cazuri, după ce s-a recoltat L.C.R. pentru diversele analize, se injectează, pe acul lăsat pe loc, foarte încet, antibioticul dizolvat în 5—10 ml apă distilată. Intrarahidian, se introduc următoarele doze : ampicilina 10—30 mg, la adult, și 3—8 mg, la copil ; gentamicina și tobramicina 3—5 mg, la adult, și 1 mg, la copil ; amikacina — 1/2 din doza notată la gentamicină ; colistina 100 000—200 000 U.I., la adult, și 5 000—15 000 U.I., la copil. Tratamentul trebuie reconsiderat, îndată ce apar date suplimentare, la examenul microscopic, în culturi și, eventual, la antibiogramă.

2.4.0.0.4. Însămînțare. Întotdeauna și, mai ales, dacă L.C.R. este opalescent și mai ales tulbure sau purulent, se însămînțează direct la patul bolnavului cu aprox. 0,1—1 ml L.C.R. *cel puțin 3 tuburi cu medii de cultură,* și anume : Mueller-Hinton (de preferință cu glucoză și cu sînge proaspăt de oaie, mediu livrat de Institutul Cantacuzino), gelozã (eventual, tot Mueller-Hinton) sînge șocolată și bulion tioglicolic (mediul nr. 1 al Institutului Cantacuzino). Mediile solide trebuie să fie proaspete și cu lichid de condensare. Dacă L.C.R. este limpede și, mai ales dacă există suspiciunea clinică de meningită tuberculoasă, se însămînțează și pe mediul Löwenstein-Jensen. Dacă există suspiciunea de meningită fungică, se însămînțează și pe mediul Sabouraud (fig. 38). Însămînțările pot fi repetate și diversificate la laborator de către un specialist microbiolog.

Aspectul macroscopic al coloniilor eventual dezvoltate, caracterele morfotinctoriale microscopice ale germenilor cultivați și, în continuare, identificările făcute de bacteriologi, vor asigura diagnosticul etiologic în meningitele bacteriene (identificarea poate fi precedată de o antibiogramă).

2.4.0.0.5. Prelucrarea L.C.R. După recoltare, se șterge bine cu alcool regiunea în care s-a făcut puncția, pentru a îndepărta pe cît se poate tinctura de iod, iar tuburile cu L.C.R. și cu mediile de cultură însămînțate se transportă *de urgență* la laborator, fiind *menținute la cald* în timpul transportului și avînd mare grijă să nu se ude dopurile. Odată ajunse la laborator, ele trebuie *imediat prelucrate* și rezultatele obținute comunicate clinicianului pe etape, dacă, precum recomandăm noi, ele nu sînt executate în paralel chiar de clinician, cel puțin pentru etapele urgente (vezi mai departe).

Scanned with OKEN Scanner

Mediile însămînțate cu L.C.R. se introduc imediat în termostat ; și tuburile cu mediu solid sînt culcate în așa fel încît suprafața mediului să fie înecată în L.C.R., dar fără ca L.C.R. *să atingă dopul !* (fig. 39). Sînt lăsate în această poziție aprox. 2 ore, în care timp elementele figurate și germenii se pot sedimenta pe suprafața mediului. Tuburile pentru cercetări virusologice * se introduc în congelator și apoi se trimit cît de curînd la laboratorul de virusologie.

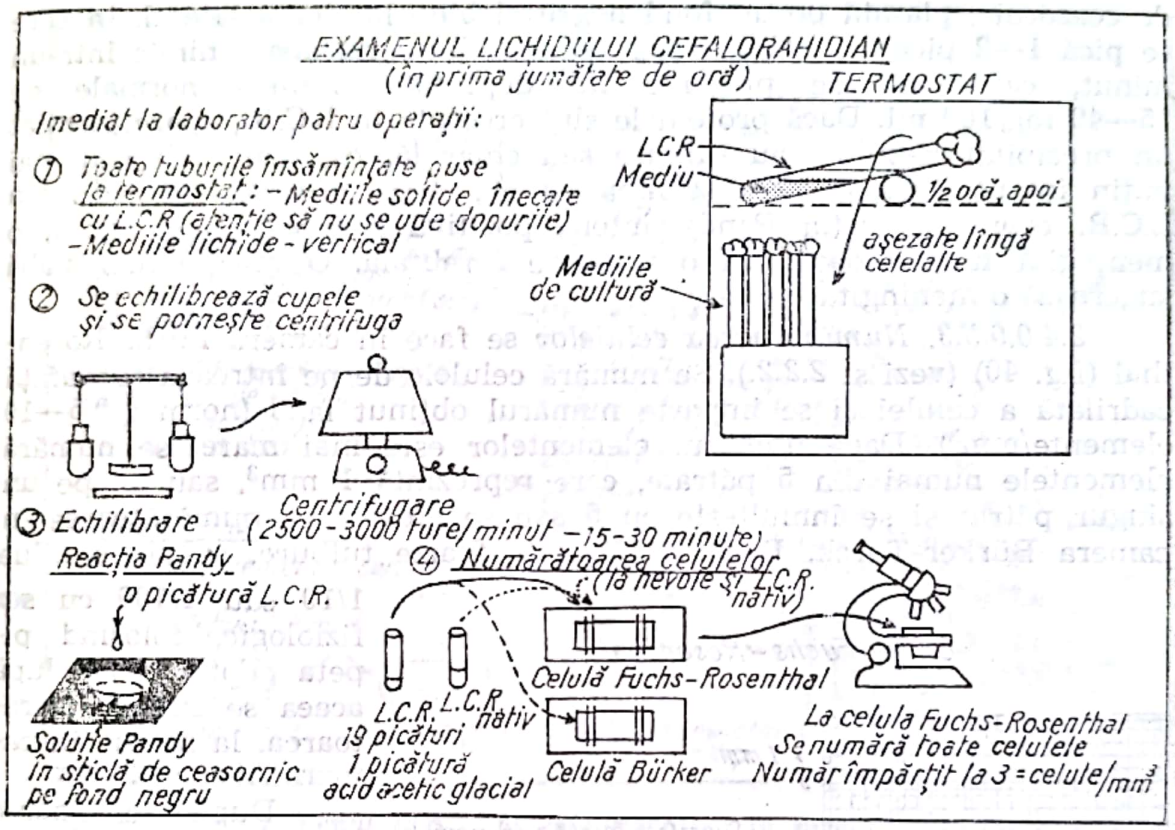


Fig. 39. — Examenul lichidului cefalorahidian în prima jumătate de oră.

2.4.0.0.5.1. Centrifugare. Imediat după aceea, se pune la centrifugă tubul cu L.C.R., bine echilibrat. Centrifugarea se face în tuburi speciale cu pereți groși și capișonate, la o turație cît mai mare (2 500—3 000 t/minut, de preferință mai mult), timp de 20—30 de minute sau chiar mai mult. Centrifuga (dacă nu se poate utiliza o centrifugă cu turație mare și răcire) trebuie oprită odată la 10—15 minute, pentru a o lăsa să se răcească timp de aprox. 5 minute, apoi este pornită din nou.

Celulele sedimentează ușor, odată cu germenii fagocitați, dar germenii liberi și în special hemofilii, avînd aproape aceeași densitate ca L.C.R., se sedimentează foarte greu și încet.

* Diagnosticul etiologic al meningitelor virale cade în sarcina laboratoarelor virusologice. Diagnosticul este tardiv și numai de interes epidemiologic, antiepidemic, științific și uneori de prognostic, dar nu duce la sentințe terapeutice, cu excepția meningoencefalitei herpetice, care tratată la timp are oarecari șanse de vindecare.

În timpul centrifugării, se ia al doilea tub cu L.C.R., se agită uşor pentru omogenizarea elementelor, dar *fără a uda dopul,* apoi se prelevează cu o pipetă Pasteur sterilă aprox. 0,5—1 ml L.C.R., din care se distribuie 1—2 picături peste 2—3 ml reactiv Pandy, cu încă alte cîteva picături se umple camera de numărat Fuchs-Rosenthal (vezi şi *2.2.2.0.2.4.*), iar 10 picături de L.C.R. se pun într-un tub de hemoliză, unde se adaugă o picătură de acid acetic glacial, care va hemoliza eventualele hematii.

2.4.0.0.5.2. Reacţia Pandy. Se pun 2—3 ml de reactiv * într-o sticlă de ceasornic, plasată pe un fond negru şi bine luminată lateral, în care se pică 1—2 picături L.C.R. (vezi fig. 39). Dacă nu apare nimic într-un minut, cantitatea de proteine nu depăşeşte limitele normale de 15—40 mg/100 ml. Dacă proteinele sînt crescute în L.C.R., apare imediat un precipitat nebulos sau tulbure sau chiar lăptos, mai mult sau mai puţin intens, ceea ce se înseamnă cu +, ++, +++, ++++. Un L.C.R. clar cu reacţia Pandy intens pozitivă sugerează, de obicei, o meningită tuberculoasă sau o tumoare cerebrală. O reacţie mai slabă sugerează o meningită virală.

2.4.0.0.5.3. Numărătoarea celulelor se face în camera Fuchs-Rosenthal (fig. 40) (vezi şi *2.2.2.*). Se numără celulele de pe întreaga suprafaţă cadrilată a celulei şi se împarte numărul obţinut la 3 (normal 0,5—10 elemente/mm^3). Dacă numărul elementelor este mai mare, se numără elementele numai din 5 pătrate, care reprezintă 1 mm^3, sau de pe un singur pătrat şi se înmulţeşte cu 5 sau se efectuează numărătoarea în camera Bürker-Türck. Dacă L.C.R. este foarte tulbure, se poate dilua 1/10 sau 1/100 cu ser fiziologic, folosind pipeta Potain şi după aceea se face numărătoarea, la nevoie în camera Bürker-Türck.

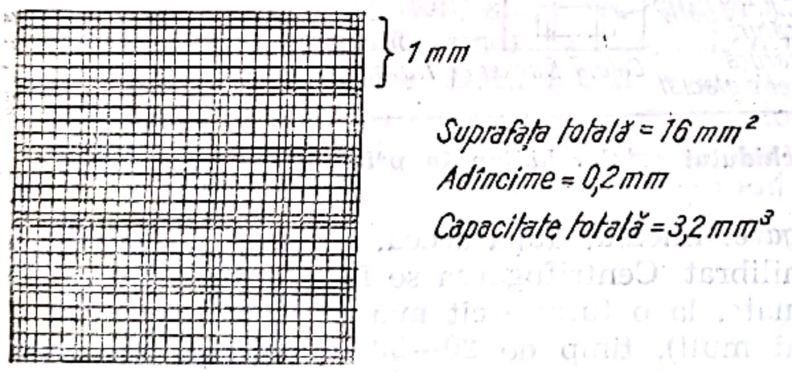


Fig. 40. — Celula Fuchs-Rosenthal.

După terminarea numărătorii, care indică totalitatea celulelor din L.C.R., se spală şi se usucă celula şi se reface aceeaşi operaţie cu L.C.R. la care s-a adăugat acid acetic şi care va indica numărul celulelor nucleate.

2.4.0.0.5.4. Dacă L.C.R. este clar sau opalescent, se păstrează restul de L.C.R. pentru urmărirea formării eventuale a unui *văl de fibrină,*

* *Reactiv Pandy.* Se adaugă 8 g fenol glacial, lichefiat la cald, la 100 ml apă distilată. Se agită bine, se lasă să matureze 24 de ore la termostat şi 4—5 zile la temperatura camerei (sau se păstrează în continuare la termostat). Se utilizează, pentru reacţie, lichidul *clar supranatant.* La rece, reactivul se tulbură de aceea trebuie păstrat la termostat şi pus în sticlă de ceasornic numai în momentul utilizării.

Scanned with OKEN Scanner

care se produce în 2—3 ore sau pînă a 2-a zi. În meningita tuberculoasă, se produce deseori un văl de fibrină foarte fin, ca o pînză de păianjen. În meningitele seroase virale, dacă se produce rareori un văl, el este de obicei floconos, iar în meningitele bacteriene, dacă se produce, el este de obicei grosolan.

2.4.0.0.5.5. Investigații biochimice în L.C.R. Încă în prima oră de la puncție, se mai fac o serie de investigații (fig. 41). După aprox. 15 minute de la pornirea ei, se oprește centrifuga, se lasă să se mai

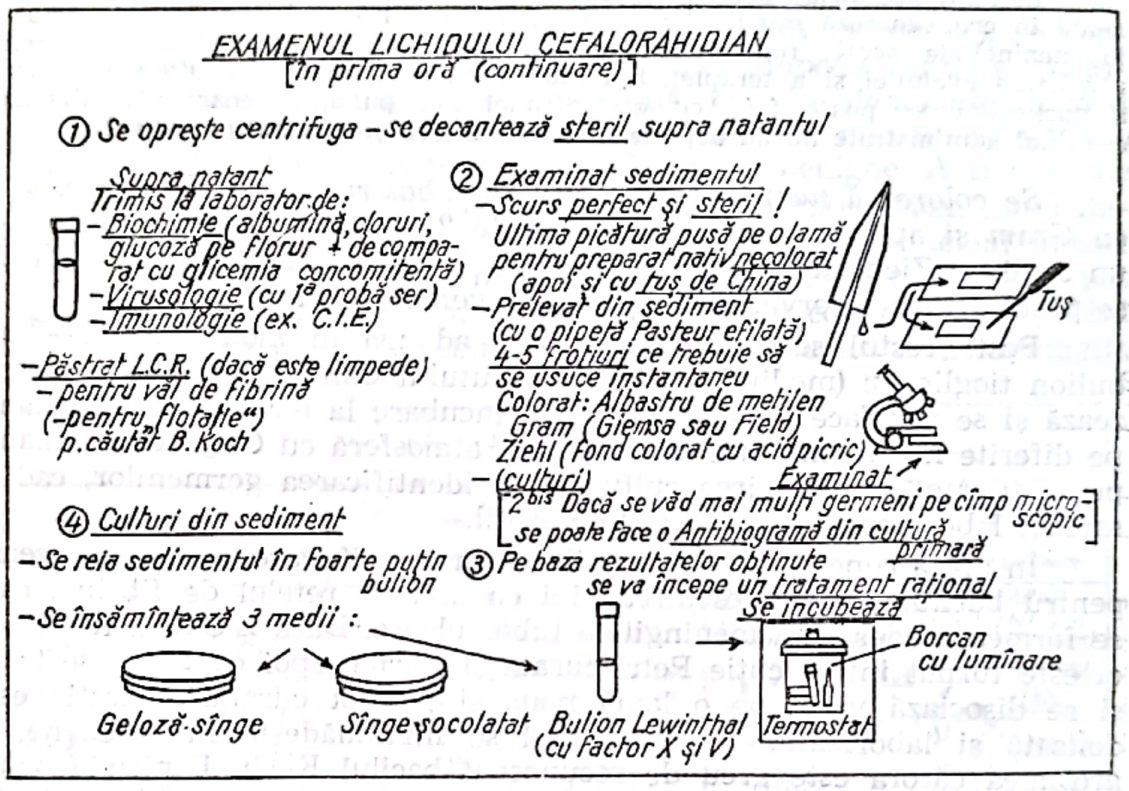


Fig. 41. — Examenul lichidului cefalorahidian în prima oră (continuare).

răcească 5 minute și apoi se pornește din nou pentru alte 15 minute. La sfîrșitul centrifugării, se scoate cu grijă capușonul, se flambează buza tubului de centrifugă și L.C.R. clar supranatant se decantează brusc într-o altă eprubetă curată și sterilă.

Din acest L.C.R. se vor face la laboratorul central, în orele următoare, dozările de *glucoză*, în paralel în L.C.R. și în sînge (2—3 ml L.C.R. în tub cu cîteva cristale mici de florură de sodiu, dacă analiza întîrzie mai mult de 3 ore), de *cloruri* și de *albumină* (pentru fiecare sînt suficiente cantități de 0,3—0,5 ml de L.C.R.).

2.4.0.0.5.6. Prepararea și colorarea frotiurilor. *După ce s-a scurs perfect tot L.C.R. supranatant*, tubul de centrifugă fiind întors cu gura în jos, se ia din sediment în mod steril cu o pipetă Pasteur sterilă efilată, cît intră prin capilaritate, și se fac imediat, pe lame noi, perfect curate și bine degresate, *cel puțin 5 frotiuri* (întinse cu pipeta sau cu o lamă ca frotiurile de sînge). Sedimentul trebuie așa de bine scurs încît

lamele să se usuce *imediat în cîteva secunde* (ca la sînge). O lamă cu un sediment care se usucă în 1—2 minute este inutilizabilă, deoarece celulele se ratatinează și nu se mai pot distinge polinuclearele de mononucleare și nici eventualii germeni fagocitați *.

Dacă există suspiciuni epidemiologice și clinice de meningite cu fungi sau cu amibe, sedimentul se examinează proaspăt, extemporaneu între lamă și lamelă, eventual la microscopul cu contrast de fază sau se lasă să difuzeze de la colțul lamelei în preparat, tuș de China sau mai bine nigrosin.

În felul acesta, se pot vedea levuri înconjurate de o capsulă groasă refringentă în criptococcoză sau amibe de Naegleria sau Hartmanella. Este de notat că în meningitele acute, repetarea punctiilor rahidiene se impune pentru drenaj, urmărirea evoluției și a terapiei, așa încît dacă este cazul cercetarea levurilor și a paraziților se poate face cu ocazia unei noi puncții, deoarece antibioticele eventual administrate nu au acțiune nici antifungică și nici antiparazitară.

Se colorează neapărat un frotiu cu albastru de metilen și *un altul cu Gram* și apoi (mai ales dacă primele 2 nu dau lămuririle scontate), un altul cu Ziehl și un altul cu Giemsa (vezi fig. 41). Al cincelea frotiu se păstrează de rezervă, pentru o nouă eventuală colorație.

Peste restul sedimentului, se pot adăuga în mod steril 2—3 ml bulion tioglicolic (mediul nr. 1 al Institutului Cantacuzino), se omogenizează și se pot face imediat sau după incubare la termostat, transplante pe diferite medii incubate aerob sau în atmosferă cu CO_2. Aceste manopere, precum și urmărirea culturilor și identificarea germenilor, cad în sarcina laboratorului central sau de profil.

În afara concentrării germenilor prin centrifugare, se mai utilizează pentru bacilul Koch „pescuirea" lui cu „plasa" rețelei de fibrină, care se formează adesea în meningitele tuberculoase. Dacă L.C.R. a făcut *văl*, el este turnat într-o cutie Petri curată și sterilă, apoi cu 2 ace se trage și se disociază vălul pe o lamă nouă și perfect curată. Operația este delicată și laborioasă. Deseori, vălul se îngrămădește în cordoane, în grosimea cărora este greu de recunoscut bacilul Koch. Pentru a ușura cercetarea microscopică, în aceste cazuri, se poate efectua colorația Ziehl, înlocuindu-se albastrul de metilen cu acid picric (vezi *1.3.7.0.2.3.*).

O serie de *alte tehnici* au mai fost propuse (flotație, filtrare prin milipor, colorație fluorescentă cu examinare în U.V. etc.). Ele sînt de resortul laboratoarelor special profilate.

2.4.0.0.5.7. Examenul microscopic citologic și microbiologic al sedimentului trebuie făcut de îndată ce frotiurile au fost colorate și uscate. Examenul trebuie făcut cu atenție și cu multă răbdare, timp de cel puțin 10—30 de minute, deoarece el este de cea mai mare însemnătate.

În mod normal, L.C.R. conține 0,5—10 limfocite/mm^3. Pe lîngă elementele normale ale sîngelui periferic, care se pot găsi în L.C.R., în caz de hemoragie meningiană sau de meningită hemoragică, în meningite se întîlnesc mai frecvent următoarele elemente :

---

* Pentru o bună păstrare a morfologiei celulelor, se poate amesteca (chiar pe lamă) o picătură de sediment cu o picătură de ser sanguin steril și apoi se face frotiul. Procedeul este bun, dar incomod.

Scanned with OKEN Scanner

Polinucleare neutrofile se constată în meningitele bacteriene (la început şi trecător cu zecile, apoi cu sutele şi miile pe mm^3), fie intacte morfologic, fie mai mult sau mai puţin alterate. Se mai găsesc polinucleare neutrofile în proporţie mică de 5—10% în meningitele tuberculoase, la începutul unor meningite virale (în poliomielită), în leptospiroze etc.

Limfocite, de aspect normal (de obicei cu zecile, rar peste 100 pe mm^3), se constată în meningita tuberculoasă, unde pot reprezenta 50—95% din celule, restul fiind reprezentat de polinucleare.

Mononucleare atipice („limfocite monocitoide", „virocite"), se constată într-o serie de meningite seroase, cu L.C.R. limpede sau uşor opalescent, de etiologie multiplă, de obicei virală, care se denumesc în mod impropriu „meningite limfocitare benigne", deoarece nici nu este vorba de limfocite şi nici nu sînt totdeauna chiar total benigne. Aceste celule au un aspect uşor polimorf, sînt ceva mai mari ca majoritatea limfocitelor, au citoplasma mai abundentă deseori mai bazofilă, nucleul uneori reniform şi cu cromatina mai puţin densă decît a limfocitului. Ele pot constitui totalitatea elementelor nucleate (100% din celulele L.C.R.), fără deloc polinucleare (spre deosebire de 5—10% polinucleare în meningita tuberculoasă) (fig 42).

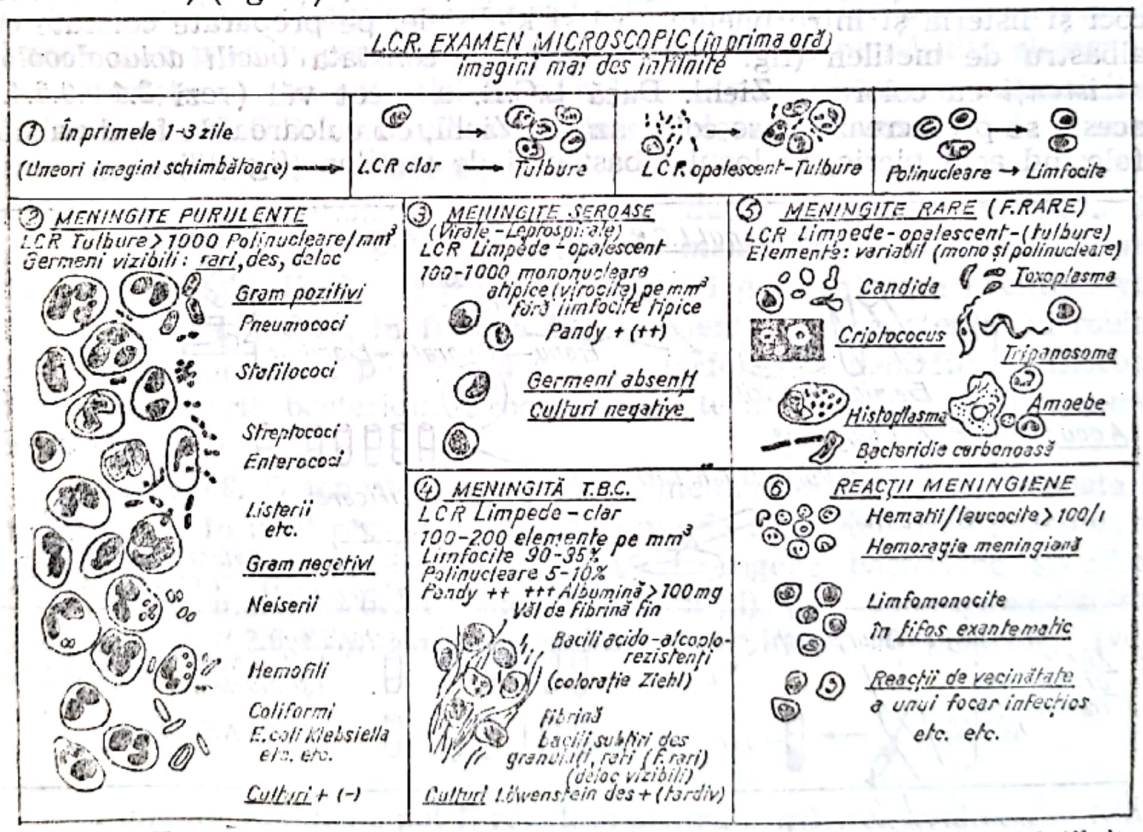


Fig. 42. — Examenul microscopic al L.C.R. în prima oră. Imagini mai des întîlnite.

Rareori, în L.C.R. se observă : *eozinofile*, în infecţii parazitare ; excepţional, *celule atipice* cu citoplasma intens bazofilă, în procese neoplazice ; mult mai rar, protozoare uninucleare ca *Histoplasma* şi *Tripanosoma* (la bolnavi cu boala somnului din Africa Centrală) ; *amibe* (Naegleria şi Hartmanella) ; *fungi* (Candida, Criptococcus).

Scanned with OKEN Scanner

Examenul leucocitelor şi, în special, al polinuclearelor trebuie făcut cu deosebită grijă, pentru a se decela eventualele *bacterii fagocitate*, care — dacă sînt gramnegative — pot fi greu de distins în citoplasma celulelor colorate de asemenea în roşu cu Gram. Din această cauză, se recomandă ca în coloraţia Gram să se facă coloraţia de fond cu fucsină sau safranină cît de palidă. Uneori, bacteriile fagocitate şi chiar cele libere se disting mai uşor în coloraţia cu albastru de metilen. În ceea ce priveşte coloraţia Giemsa, dacă soluţia de colorant în apă nu s-a făcut într-un vas perfect curat, se pot găsi bacterii, nu din L.C.R., ci din colorant ! Aceeaşi eroare se poate face dacă tubul în care s-a centrifugat L.C.R. nu a fost *perfect curat* şi steril. O floră polimorfă şi mixtă, dacă s-au eliminat cauzele de eroare menţionate mai sus, indică de obicei o meningită de origine otică sau secundară unui abces cerebral, deseori cu anaerobi.

În preparatele colorate cu Gram se pot observa : *diplococi gramnegativi*, în bob de cafea, des inegali, liberi sau fagocitaţi ; *diplococi grampozitivi lanceolaţi*, înconjuraţi de o capsulă ; *coci grampozitivi* în grămezi sau în lanţuri ; *cocobacili*, gramnegativi şi grampozitivi, cu oarecare polimorfism ; *bacili*, grampozitivi şi gramnegativi, eventual încapsulaţi. De evitat confuzia între pneumococi şi streptococi, între pneumococi şi listeria şi între pneumococi şi klebsiele, pe preparate colorate cu albastru de metilen (fig. 42). Se mai pot constata *bacili acidoalcoolorezistenţi* cu coloraţia Ziehl. Dacă L.C.R. a făcut văl (vezi 2.4.0.0.5.4.), acesta se prelucrează şi se colorează cu Ziehl, cu culoarea de fond palidă, folosind acid picric, în locul albastrului de metilen (fig. 43).

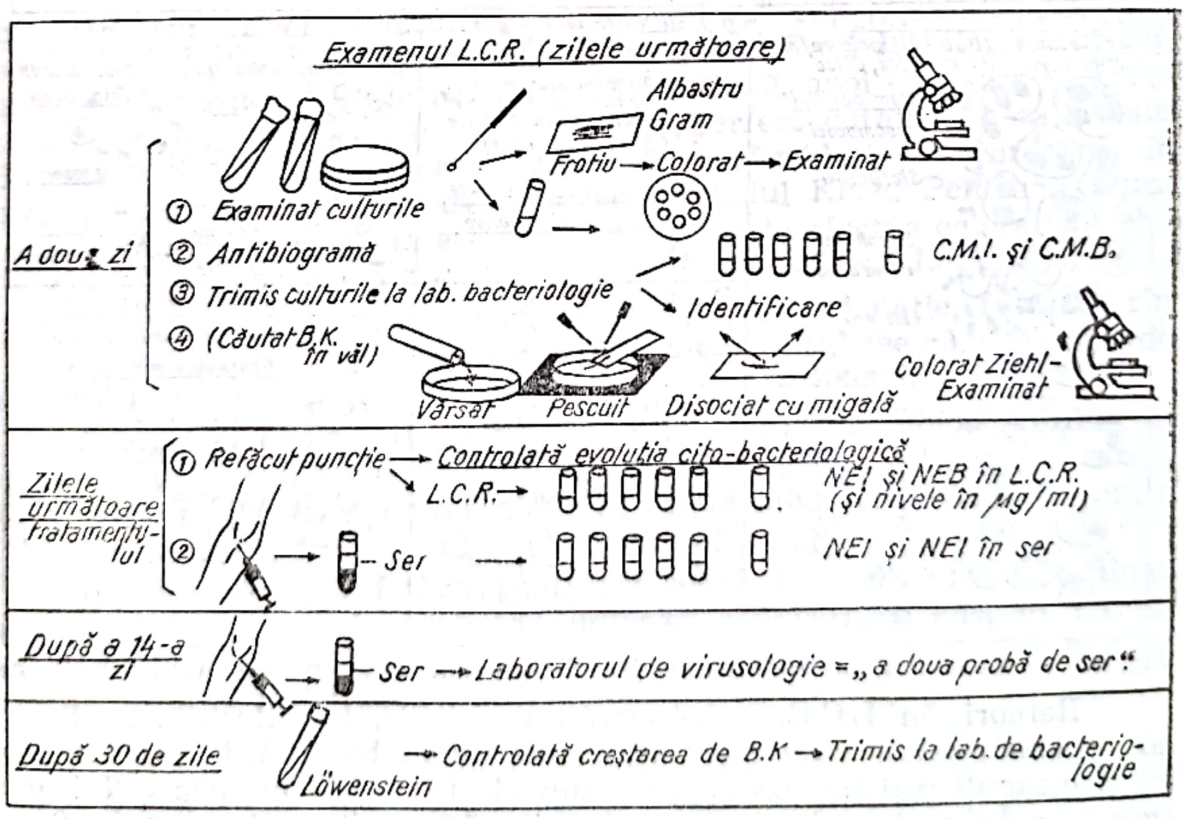


Fig. 43. — Examenul L.C.R. în zilele următoare.

Dacă numărul de bacterii este peste 10—50, în medie, pe cîmp microscopic, se recomandă să se facă o antibiogramă directă, urmînd să fie repetată a doua zi pe cultura pură în condiții clasice.

Examenul extemporaneu al L.C.R., care poate fi terminat în aprox. 1 oră de la executarea punctiei rahidiene, asigură totdeauna o serie valoroasă de suspiciuni și, deseori, chiar o certitudine de diagnostic etiologic. Pe baza acestor constatări, se poate începe un tratament rațional, chiar înainte de a avea rezultate suplimentare de laborator.

În contextul epidemiologic și clinic al cazului și al examenului elementar mai sus citat al L.C.R., se pot degaja argumente foarte puternice în favoarea diagnosticului de *meningită tuberculoasă*, dacă L.C.R. este clar, cu reacția Pandy intens pozitivă, cu numărul de celule moderat crescut, compuse 90—95% din limfocite și restul din polinucleare. Suspiciunea se întărește dacă lichidul face văl și dacă glicorahia (și clorurorahia) sînt net scăzute.

Se poate face, în schimb, suspiciunea de *meningită* mai benignă, de obicei *virală*, dacă L.C.R. este clar sau opalescent, cu o citologie compusă exclusiv (100%) din mononucleare atipice fără polinucleare. Dacă L.C.R. este clar, elementele moderat crescute, compuse la început și trecător din polinucleare și limfocite, apoi din limfocite, cu reacția Pandy slab pozitiv, care să evolueze către scăderea numărului elementelor și creșterea concentrației proteinelor, se poate bănui o poliomielită. În fine, dacă L.C.R. este tulbure, cu polinucleare, diagnosticul de *meningită bacteriană* este aproape sigur.

Diagnosticul etiologic este asigurat, dacă se constată prezența de germeni cu caracterul morfotinctorial de *meningococi, pneumococi, stafilococi* și *bacili Koch*. În privința celorlalți germeni care eventual pot fi observați în L.C.R., în funcție de experiența și competența microbiologului, se pot bănui pe simplu aspect morfologic : hemofili, stafilococi, klebsiele, listerii, bacteridia carbonoasă, bacterii enterale, anaerobi, paraziți și fungi.

2.4.0.0.5.8. Diagnosticul etiologic al meningitelor bacteriene poate fi pus deseori, în mod rapid, dacă se dispune de unele tehnici de laborator, capabile de a decela cantități mici de antigene bacteriene specifice (pneumococ, meningococ, Haemophilus și alții), prin *contraimunelectroforeză* (vezi *2.2.6.0.7.*), coaglutinări de stafilococi cu proteine (vezi *2.2.6.0.2.*).

★

Punctiile rahidiene pot fi repetate pentru urmărirea evoluției meningitei și pentru controlul unei eventuale antibioticoterapii, cu determinări de concentrații de antibiotic și determinări de NEI și NEB în L.C.R. (vezi cap. *4.3.2.3.*).

De asemenea, se va lua legătură cu laboratorul de microbiologie (pentru bacilul Koch) și de virusologie, pentru urmărirea reacțiilor serologice și virusologice.

2.5. EXAMENUL EXSUDATULUI FARINGIAN ŞI NAZAL, PENTRU DIAGNOSTICUL INFECŢIILOR CĂILOR RESPIRATORII SUPERIOARE

Obiectiv :

— diferenţierea între infecţiile virale şi cele bacteriene sau de altă natură ;

— evidenţierea (sau eliminarea) principalelor bacterii de regulă patogene ale acestor regiuni şi diferenţierea purtătorilor, eventual periculoşi, de bolnavi ;

— argumentarea, cantitativă şi proporţională, pentru incriminarea unor bacterii oportuniste într-un proces patologic.

Avînd în vedere că nasul, gura, amigdalele şi faringele sînt normal populate de un număr imens de germeni saprofiţi şi oportunişti, că aceste regiuni se pot infecta cu un număr foarte mare de virusuri, bacterii (şi protozoare), obiectivele de mai sus sînt greu de îndeplinit.

Vom descrie doar metodele de recoltare, examenul microscopic şi modul curent de însămînţări, deoarece examenele culturale virusologice şi serologice etc. cad în sarcina medicilor specialişti de laborator. Modul de recoltare diferă în funcţie de regiunea explorată (fig. 44).

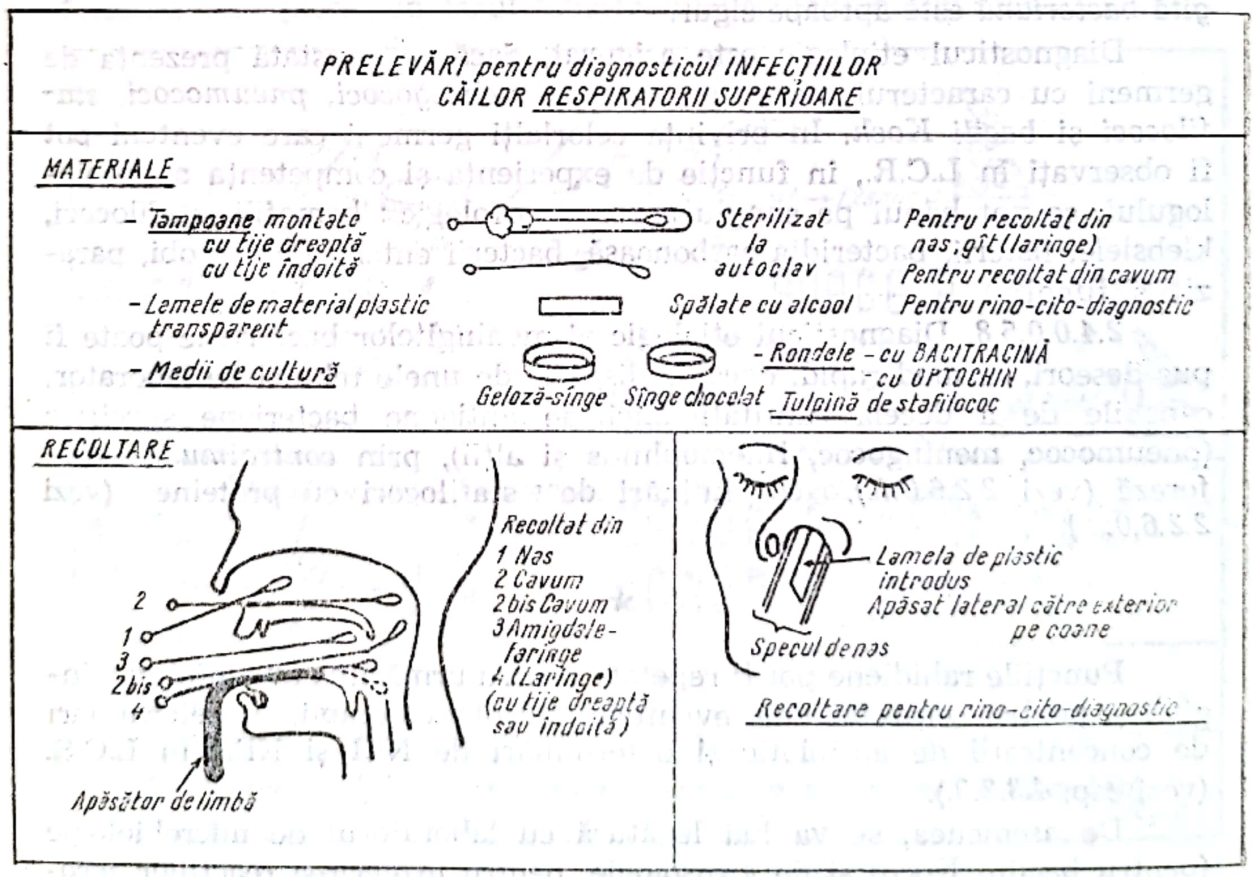


Fig. 44. — Prelevări pentru diagnosticul infecţiilor căilor respiratorii superioare.

În practică, situaţia este de obicei mai simplă, deoarece argumentele epidemiologice, clinice şi hematologice permit de multe ori recunoaşterea sau suspectarea unor boli virale (boli eruptive, herpes, infecţii cu Coxsackie, mononucleoză infecţioasă etc.), recunoaşterea unor boli de sînge (în special, leucemii şi agranulocitoze), leziuni posttraumatice sau postcaustice, suspectarea unor procese proliferative şi chiar adesea a unor infecţii bacteriene specifice uzuale, cum este infecţia cu streptococi beta-hemolitici grup A, sau altele actualmente rar întîlnite (difteria, tuberculoza, antraxul, luesul, gonoreea etc.).

Practic, numai relativ puţine boli bacteriene pot profita de un tratament etiotrop şi faţă de acestea diagnosticul etiologic este deosebit de important.

Bacteriile patogene mai periculoase şi de interes epidemiologic sînt: *streptococul beta-hemolitic* (Streptococcus pyogenes) grup A, *bacilul difteric* (Corynebacterium diphteriae) şi mai rar (mai ales la copilul mic) şi *Haemophylus influenzae.* Încă mai rar, pot fi incriminaţi în procesul patologic alte bacterii: stafilococul auriu, pneumococul, klebsiele, candida, asociaţia fuzospirilară şi (mai ales la copii) bacterii enterale. Toţi aceştia sînt, de regulă, comensali, dar pot deveni patogeni, uneori ca o suprainfecţie în viroze, la imaturi şi sugari şi în toate stările de slăbire a puterii de apărare a macroorganismului sau în unele dezechilibrări ecologice ale florei normale, în urma unei antibioticoterapii.

Suspectarea rolului patogen al germenilor oportunişti se bazează pe coexistenţa unor fenomene locale clinic decelabile, existente la aceste niveluri, a unui număr foarte mare de germeni de acelaşi fel şi predominanţa lor netă asupra florei saprofite (apreciere cantitativă şi proporţională).

În infecţii dentare şi peridentare, în criptele amigdaliene, în cavităţile sinuzale şi în cursul otitelor medii, se poate constata deseori o floră mixtă aerobă şi anaerobă.

Infecţiile virale, cele cu micoplasme sau cele cu chlamidii nu pot fi diagnosticate decît prin metode speciale. Gripa însă poate fi suspectată (pe lîngă argumentele epidemiologice şi clinice), prin simpla punere în evidenţă a unor incluziuni citoplasmatice în celulele epiteliale şi în leucocitele recoltate de pe coanele nazale *(rinocitodiagnostic)* (Pavlovsky) * (vezi fig. 44).

---

* Se prelevează celule epiteliale şi leucocite de pe coanele nazale cu ajutorul unei lamele de plastic de cca 100 mm lungime şi 6—8 mm lăţime, care se introduce în nas şi se aplică pe coane (de la sept către exterior). Se lasă să se usuce, se fixează repede în alcool, se flambează, apoi se introduce 15—20 sec. în colorant. Se clăteşte repede cu apă şi se examinează cu imersie. Apariţia de incluziuni roşii, amorfe, în citoplasma unor celule, întăreşte mult suspiciunea de gripă.

Colorantul de lucru făcut proaspăt se păstrează cîteva săptămîni la rece şi este compus din 20 ml apă distilată, la care se adaugă 0,1 ml sol. alcoolică saturată de *fucsină bazică* şi 0,4—0,6 ml (de încercat) de soluţie alcoolică saturată de *albastru de metil* (soluţiile alcoolice se lasă în prealabil să mature 1—2 zile la 37°).

2.5.0.0.1. Recoltarea. În toate infecţiile superficiale şi difuze, recoltarea se face cu *tamponul* (nazal, nazofaringian din cavum, amigdalofaringian). În leziunile circumscrise, cu depozite sau cu false membrane, precum şi în leziunile ulcerative, recoltarea se face de preferinţă ţintit, cu o *ansă rigidă de platină.* La nevoie (copiii şi persoanele care nu cooperează), se poate folosi un tampon mic, cu care să se preleveze din leziuni, evitînd să se atingă limba şi restul mucoasei bucale, care conţin un număr imens de feluriţi germeni. Pentru puroiul din sinusuri sau din urechea medie, se poate folosi o seringă cu un ac bont. Prelevarea de pe epiglotă se face cu tampon, fie direct, dacă epiglota devine vizibilă atunci cînd se deprimă bine baza limbii cu un apăsător metalic îngust, sau orbeşte cu tamponul aplicat pe un apăsător de limbă, pe care trebuie să-l depăşească puţin, punînd bolnavul să tuşească sau să facă expiraţii puternice (vezi fig. 44). Recoltarea poate fi făcută în condiţii bune de către un laringolog (difteria laringiană este de regulă secundară sau coexistă cu o difterie faringiană, ceea ce uşurează diagnosticul).

Se fac, după caz, prelevări unice sau concomitent 3 prelevări : nazală, nazofaringiană (din cavum) şi amigdalofaringiană (vezi fig. 44).

Recoltarea şi frotiurile se fac la patul bolnavului. Însămînţările trebuie făcute imediat, fie la patul bolnavului, fie în laborator, folosind tampoane recoltate de la bolnav şi trimise urgent la laborator (eventual, cufundate în medii de conservare, de ex. mediul Stuart).

Examinarea frotiurilor colorate, a culturilor primare şi mai ales identificările ulterioare se fac în laborator de către un personal specializat. Considerăm însă indispensabil ca şi clinicianul să ştie cum se „citeşte" la microscop o lamă, cum se face o însămînţare corectă şi ce informaţii preliminare de suspiciune etiologică poate furniza examenul macroscopic al culturii primare. În felul acesta, se poate deseori face un triaj şi o degrevare a laboratorului central de unele analize complementare devenite inutile şi se poate întări colaborarea bilaterală între clinică şi laborator (şi invers).

Staphylococcus epidermidis, streptococul viridans, neisseriile nepretenţioase şi bacilii difteromorfi sînt comensali obişnuiţi ai mucoaselor şi *nu produc infecţii* ale căilor respiratorii superioare, ei constituind flora normală. În consecinţă, nu trebuie luaţi în considerare în diagnosticul etiologic al acestor infecţii şi încă mai puţin nu trebuie testaţi faţă de antibiotice (antibiograma este inutilă, iar tratarea bolnavilor cu asemenea germeni cu antibiotice nu poate duce decît la tulburarea ecologiei normale a florei).

Stafilococul auriu (coagulazopozitiv) şi pneumoccocul se găsesc în mod normal la foarte multe persoane normale şi, uneori (mai ales la copii), se găsesc bacili gramnegativi din flora intestinală şi candide. Numai dacă aceşti germeni sînt în număr net preponderent şi, mai ales, într-o anumită regiune inflamată, se poate deduce că au un eventual rol patogen (de ex., în otite, sinuzite).

2.5.0.0.2. Frotiuri. Din produsul patologic se fac frotiuri, care se colorează cu albastru de metilen şi cu Gram, eventual cu Ziehl, cu Giemsa sau, uneori, şi cu alte coloraţii speciale. Acest examen este hotă-

Scanned with OKEN Scanner

rîtor, pentru punerea în evidenţă a unei asocieri fuzospirilare şi sugestivă pentru difterie, eventual rareori pentru alte infecţii bacteriene.

Examenul microscopic nu permite diferenţierea între stafilococul auriu (des patogen) şi stafilococul epidermidis (de obicei nepatogen). În privinţa diferenţierii dintre bacilii difterici şi bacilii difteromorfi, se ia în considerare aşezarea lor diferită neregulată, prezenţa de corpusculi metacromatici şi faptul că se lasă mai uşor decoloraţi cu alcool-acetonă la coloraţia Gram (decolorarea se face rapid pe toată lama şi apoi o jumătate de lamă este decolorată mai prelung) (fig. 45).

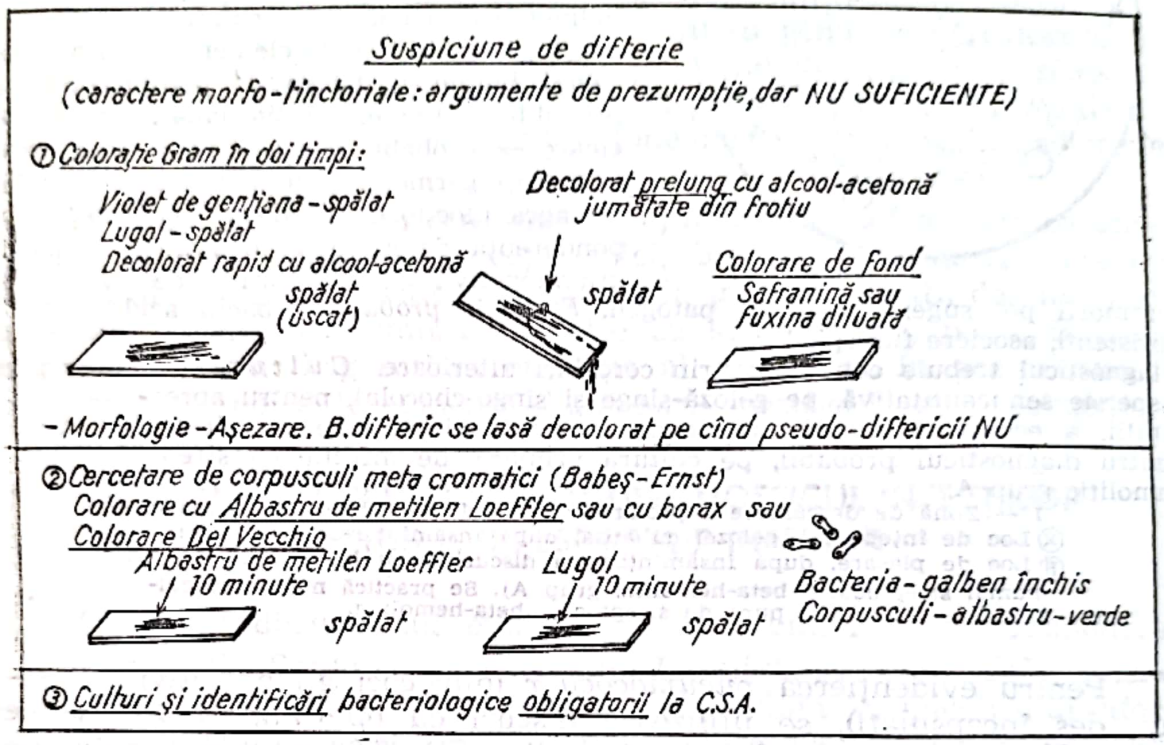


Fig. 45. — Suspiciune de difterie. Examenul bacteriologic direct al exsudatului faringian.

2.5.0.0.3. Culturi. Cu produsul patologic se fac ***însămînţări prin dispersie progresivă semicantitativă*** (fig. 46), pe 2 cutii Petri, una cu geloză-sînge, alta cu geloză-sînge şocolată. În caz de suspiciune de difterie, actualmente eventualitate foarte rară, se apelează la laboratorul central sau la laboratorul C.S.A.

Aprecierea ***semicantitativă*** a bacteriilor mai ales a streptococilor beta-hemolitici grup A (puţine, dacă cresc numai în primele 2 sectoare, numeroase şi foarte numeroase, dacă cresc şi în sectoarele 3 şi mai ales 4) şi *proporţională* (de ex., un anume fel de colonie, un anume germen, reprezintă sub 25%, sau 50%, 75%, şi peste din totalul coloniilor) este de mare importanţă, pentru aprecierea rolului patogen şi special dacă este vorba de un oportunist.

Pentru identificarea prezumtivă a *streptococului beta-hemolitic* grup A (coci grampozitiv în lanţuri), de mare importanţă practică, se utilizează pe culturi pure, abundent crescute, discuri cu *bacitracină*

(0,04 U.I. per disc), care inhibează cca 95% din streptococii grup A pe o arie de obicei mai mare de 7—10 mm ∅, dar nu și alți streptococi. Streptococii grup B produc și ei beta-hemoliză, dar nu sînt inhibați de bacitracină (vezi fig. 46).

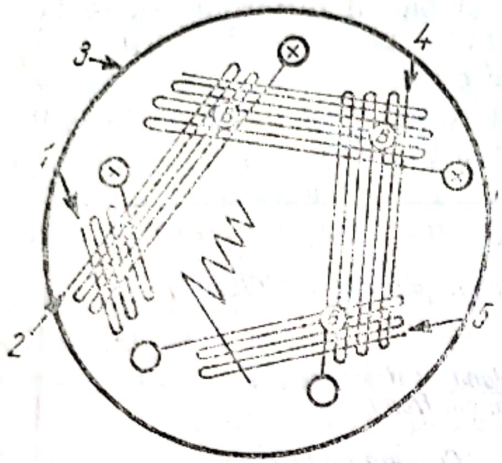


Fig. 46. — Diagnosticul infecțiilor tractusului respirator superior (examenul exsudatului faringian). Analize simple, de valoare sugestivă, preliminare diagnosticului etiologic.

În *frotiul colorat* (se va ține seama de bolnav și de locul recoltării), se studiază prezența și preponderența elementelor citobacteriene. *Etiologie sugestivă:* polinucleare → probabil infecție bacteriană; mononucleare → probabil infecție virală la început; numeroși germeni, fără polinucleare, atenție la agranulocitoză. *Etiologie posibilă:* preponderența de streptococi, stafilococi, bacili gramnegativi, ca și prezența de bacilii diteromorfi pot sugera rolul lor patogen. *Etiologie probabilă:* bacili acido-alcoolo-rezistenți, asociere fusospirilară.

Diagnosticul trebuie confirmat prin cercetări ulterioare. *Culturile* se fac prin dispersie semicantitativă, pe geloză-sînge și sînge-chocolat, pentru aprecierea masivității, a ecologiei, a florei preponderente și obținerea de colonii izolate, ca și pentru diagnosticul probabil, pe cultură primară, de infecție cu streptococi beta-hemolitic grup A.

1 — Zonă de descărcare a produsului. *2—3—4—5* — Dispersii succesive.
⊗ Loc de înțepare a gelozei cu ansa, după însămînțarea fiecărui sector.
Ⓑ Loc de plasare, după însămînțare, a discurilor cu bacitracină (inhibă numai streptococul beta-hemolitic grup A). Se practică numai pe culturi pure de streptococ beta-hemolitic.

Pentru evidențierea *pneumococilor* (diplococi grampozitivi lanceolați, des încapsulați), se utilizează discuri cu *optochin* (5 μg/disc de 6 mm ∅, care se poate obține prin aplicare de 0,02 ml per disc dintr-o soluție de 0,1 g/400 ml), care inhibează pneumococul pe o arie de cel puțin 15—18 mm ∅, dar nu și steptococii viridans și enterococii, cu care ar putea fi confundat (fig. 47).

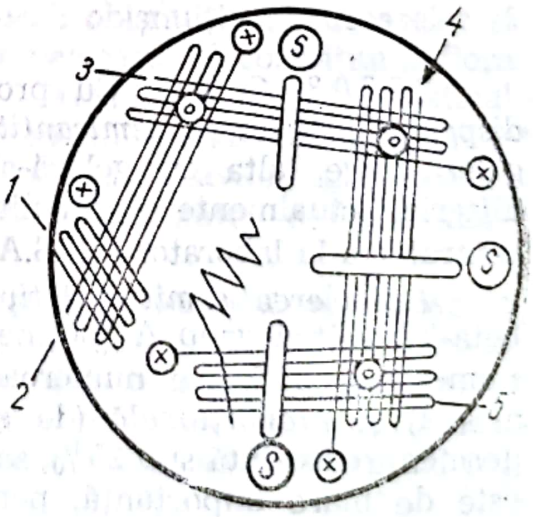


Fig. 47. — Diagnosticul infecțiilor tractusului respirator superior (continuare) *și inferior.* Culturile se fac prin dispersie semicantitativă pe geloză-sînge și sînge-chocolat, pentru diagnosticul, pe cultură primară, de infecție cu hemofili (sau pneumococică, dar în spută, nu în salivă !).

1 — Zonă de descărcare a produsului. *2—3—4—5*— Dispersii succesive.
⊗ Loc de înțepare a gelozei cu ansa, după însămînțarea fiecărui sector.
Ⓢ Însămînțarea în striu cu stafilococ coagulazo-pozitiv (după însămînțarea mediului cu produsul de cercetat), care permite, în vecinătatea lui, dezvoltarea de colonii mici de hemofili, prin satelitism.
⊙ Loc de plasare, după însămînțare, de discuri cu optochin, care inhibă pneumococul, dar nu inhibă enterococul (de repetat pe culturi pure).

Pentru evidențierea *hemofililor* (cocobacili gramnegativi), se utilizează fenomenul de *satelitism* față de un stafilococ coagulazopozitiv (eventual, stafilococul de referință pentru antibiogramă), examinîndu-se coloniile mici, bine vizibile cu lupa, crescute pe geloză-sînge șocolată, numai în vecinătatea culturii de stafilococ (fig. 47).

Cele 3 examene de mai sus se fac pe subculturi pure. Ele au doar o valoare orientativă, dar totuși ele sînt în peste 80% fidele. Aplicarea de rutină de discuri cu bacitracină și optochin și tragerea unei linii de inoculare cu stafilococ, chiar pe cultura primară, poate deseori da rezultate înșelătoare, des fals negative.

Prezența de *capsulă*, evidențiată printr-o zonă de refringență în jurul bacteriilor, cînd se coboară puțin condensatorul microscopului (sau cînd se examinează un preparat umed amestecat cu tuș), coincide de obicei cu patogenitatea germenului (pneumococi, hemofili, bacteridie carbonoasă, klebsiele etc.).

Prezența de *levuri* în cantitate mare, mai ales dacă aceasta coincide cu leziuni clinic vizibile, la copii mici, bătrîni, la bolnavi cu stare generală alterată, la diabetici, uremici și la imundeprimați, dar mai ales la persoane care au primit antibiotice cu spectru larg, poate fi luată în considerare în diagnosticul etiologic al unei boli. În aceste cazuri, se pot pune de obicei în evidență și anticorpi specifici în serul bolnavilor.

2.6. EXAMENUL SPUTEI PENTRU DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR TRACTUSULUI RESPIRATOR INFERIOR

Obiectiv : diagnosticul etiologic al afecțiunilor bronhopulmonare.

Observație. Sputa este un amestec de salivă, secreții nazofaringiene și bronhoalveolare. Examenul sputei, în privința diagnosticului afecțiunilor bronhopulmonare, este în bună parte nesatisfăcător, deoarece uneori nu furnizează date utile, iar alteori poate induce în eroare. Totuși, acest examen trebuie făcut, deoarece deseori poate lămuri diagnosticul etiologic al unui proces bronhoalveolar.

2.6.0.0.1. Limite și valoare. Punerea în evidență a agentului etiologic în spută este posibilă numai în afecțiuni „deschise", bronhoalveolare sau parenchimatoase, deschise în căile respiratorii (nu acele închise, cum sînt des infecțiile hematogene).

Examenul sputei, calitativ și cantitativ, macro- și microscopic, precum și cultural, nu are valoare decît dacă se încadrează în contextul epidemiologic, evolutiv și clinico-radiologic, al bolnavului. Examenul microscopic al sputei nu asigură, întărește sau sugerează diagnosticul etiologic decît în relativ puține cazuri, ca de ex. în tuberculoză și în infecții cu paraziți. În infecțiile pulmonare cu stafilococi, klebsiele, hemofili (mai rar cu piocianic sau cu enterobacterii și cu Candida), diagnosticul etiologic este supus la erori, deoarece acești germeni pot fi saprofiți nepatogeni orofaringieni, și deci pot fi evidențiați în spută, în lipsa infecțiilor respiratorii.

Scanned with OKEN Scanner

Valoarea examenului sputei este condiționată de următoarele 4 puncte, care nu și-au găsit deocamdată o rezolvare bună:

— evitarea contaminării secreției bronhoalveolare (singura care poate da indicații) cu flora ororinofaringiană, în timpul expectorației sau prin scurgerea secrețiilor din gură și nazofaringe către căile respiratorii inferioare sau prin introducerea lor acolo prin bronhoscopie;

— decontaminarea rapidă (imediată) și eficace a secreției bronhoalveolare (deseori aderentă, mucoasă și fibrinoasă) de flora ororinofaringiană (extrem de bogată) supraadăugată;

— recunoașterea și izolarea porțiunilor reprezentative din unele spute mucofibrinoase și aderente, metode care prezintă dificultăți practice de execuție;

— omogenizarea secreției bronhoalveolare, atunci cînd trebuie să se obțină o repartiție uniformă a elementului, în așa fel, încît să nu fie o deosebire prea mare între diferitele cîmpuri microscopice.

Criteriul morfotinctorial nu este decît uneori suficient pentru identificarea germenilor bacterieni, parazitari sau micotici și deseori trebuie să se recurgă la examene complementare de specialitate (bacteriologice, micologice, parazitologice, virusologice, culturale, biochimice și imunologice, directe și indirecte).

Diferențierea dintre germenii cu implicație etiologică în afecțiunile bronhopulmonare (patogeni și oportuniști), pe de o parte, și acei de contaminare a secreției bronhoalveolare prin salivă sau secreție rinofaringiană, pe de altă parte, este deseori posibilă (prin aprecieri morfotinctoriale sau culturale *cantitative* și *proporționale* între diferiți germeni), dar numai în cazul infecțiilor unietiologice (în special acute). Această diferențiere este foarte dificilă sau chiar imposibilă în afecțiuni pulmonare plurietiologice, în infecții mixte, în infecții cronice, la bolnavii intubați și la acei cu deficiențe sau imaturități imunologice, la cei internați în secții de terapie intensivă și intens și repetat super- sau suprainfectați.

În aceste cazuri, de multe ori, examenul macroscopic al sputei (cantitativ, aspect, culoare și eventuale stratificări), dă informații mai utile decît simplul examen microscopic și chiar cultural al sputei.

Pentru evitarea sau atenuarea situațiilor, care pot falsifica rezultatele, se pot folosi diferite tehnici, privind modul de recoltare și de tratare imediată a sputei. Avînd în vedere importanța covîrșitoare a acestor manopere, se recomandă cu insistență ca acestea să fie făcute la „patul bolnavului" sau în „cabinetul de consultații" de însuși medicul tratant, de „terapeutul respirator" sau de medicul de laborator clinic, dar nu de un personal ajutător, pe baza unei simple indicații, dacă acest personal nu este bine instruit și deosebit de conștiincios.

Baciloscopia pentru bacilii Koch, la bolnavii de tuberculoză pulmonară, face excepție de la aceste indicații.

Examenul microscopic propriu-zis al preparatelor, examenul cultural și identificarea germenilor, deși necesită o bună pregătire profe-

Scanned with OKEN Scanner

sională, expun la mai puține erori decît recoltarea necorespunzătoare. Rezultate satisfăcătoare se obțin numai printr-o bună și inteligentă cooperare între bolnav, personalul sanitar, clinician și medicul de laborator clinic.

Infecțiile respiratorii bronhopulmonare și pleurale pot fi pricinuite de un număr foarte mare de *virusuri, de chlamidii, rickettsii, micoplasme, bacterii, fungi* și *paraziți*. Infecțiile pot fi *aerogene* sau *hematogene* (mai rar limfogene din aproape în aproape, în special în urma unor infecții subdiafragmatice, care pot interesa pleura). De multe ori, infecțiile bacteriene sînt secundare unor infecții virale, alteori unei staze sanguine, unor infarcte (deseori postoperatorii pe organe abdominale) sau unui proces proliferativ.

Diagnosticul etiologic trebuie sprijinit pe date epidemiologice, clinice, radiologice, microbiologice și serologice. Agentul etiologic poate uneori fi izolat și din sînge prin hemocultură, precum și din exsudate pleurale, în empieme sau în abcese pulmonare. Prezența de antigene specifice în spută, detectate prin tehnici fine, de anticorpi specifici în ser (mai ales în dinamică), pot constitui un argument puternic (uneori chiar hotărîtor), în privința diagnosticului etiologic.

Examenul bacteriologic trebuie făcut, pe cît posibil, înainte ca bolnavul să fi început un tratament antimicrobian sau după ce acest tratament a fost întrerupt de 2—3 zile (pentru bacilul Koch, se întrerupe 8—15 zile). În caz contrar, flora decelată poate să nu fie reprezentativă pentru agentul etiologic căutat.

2.6.0.0.2. Recoltarea. Produsul patologic cel mai reprezentativ este, teoretic, sucul pulmonar obținut prin *biopsie* sau *puncție pulmonară* (tehnică de excepție și cu riscuri mari, dar care s-a dovedit singura capabilă de evidențiere la început a agentului pneumopatiei grave, deseori mortale, denumită „boala legionarilor").

De asemenea, produsul dintr-un *abces pulmonar*, un *empiem* sau o *pleurezie* de vecinătate au o mare valoare și numai din aceste produse este cazul, eventual, să se facă cercetări pentru anaerobi.

De multe ori, bolnavii cu afecțiuni respiratorii tușesc și expectorează. *Secreția bronhoalveolară* provenită din căile respiratorii inferioare constituie un produs patologic important, dar de regulă supracontaminat cu o foarte bogată și variată floră orofaringiană, cu un conținut microbiologic de mii și poate chiar de milioane de ori mai bogat decît al secreției bronhoalveolare adevărate. Acestea constituie o importantă cauză de eroare.

Pentru scăderea riscului de contaminare a secreției bronhoalveolare, sputa poate fi recoltată prin *puncție traheală* (manoperă cu riscuri mici, dar nepracticabilă de rutină, care totuși poate da pînă la 20% rezultate fals pozitive, prin punerea în evidență a unor germeni eventual patogeni la bolnavi fără infecții ale căilor respiratorii inferioare).

Bronhoscopia permite prelevări țintite (prin aspirație, spălări, periaj sau biopsie), dintr-un anumit teritoriu, dar în timpul anesteziei locale și a introducerii bronhoscopului se antrenează germeni din nazofaringe, care pot compromite rezultatul.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultate mai puțin bune se pot obține cu ajutorul unor *tampoane* menținute supraglotic, în timp ce bolnavul tușește sau face expirații bruște și forțate. Tamponul poate fi introdus prin nas pînă în cavum sau prin gură pe un apăsător de limbă, pe care-l va depăși puțin și care va apăra tamponul de contactul cu saliva (vezi mai înainte și fig. 44). Acest fel de recoltare se folosește la copii și la bolnavii care nu pot coopera. Rezultatele cele mai puțin bune, în privința contaminării secreției bronhoalveolare cu salivă, dar la care totuși se recurge de rutină, din comoditate, și mai ales prin faptul că se pot alege spre examinare macroscopică porțiunile cele mai reprezentative din produs (porțiuni purulente galben-verzui și opace, porțiuni sanguinolente, dopuri bronșice), este *sputa eliminată prin gură*. Se alege în special, sputa expectorată dimineața după tuse („ruptă din piept").

Recoltarea corectă necesită o bună *cooperare* din partea bolnavului și o *bună instruire și supraveghere* din partea unui personal medical competent și conștiincios. Ea trebuie făcută, pe cît posibil, înainte ca bolnavul să fi primit antibiotice.

În primul rînd, clinicianul trebuie să decidă dacă este cazul să se facă un examen de spută și în ce să consiste acesta (simpla baciloscopie pentru bacil Koch, examen citobacteriologic, examen virusologic etc.). În continuare, clinicianul trebuie să explice clar pacientului ce se cere de la el, instruindu-l cînd și cum trebuie să procedeze. În general, în afecțiunile acute se examinează numai sputa eliminată după un acces de tuse ; în afecțiunile cronice și la bolnavii care expectorează mult, se recoltează toată sputa pe 24 de ore într-un vas *curat* și steril cu capac, pentru a se aprecia cantitatea și aspectul macroscopic (seros, mucofibrinos, purulent, opac, gălbui sau verzui, eventual stratificat). În plus, se recoltează separat și spută proaspăt emisă, de preferință dimineața după tuse pentru examenul microscopic.

Dacă bolnavul are secreții nazofaringiene abundente, el le va elimina înainte de recoltarea sputei, iar medicul va controla dacă se văd secreții venite din cavum. După aceasta, bolnavul își va spăla bine dinții cu peria și cu apă (fiartă și răcită), dar fără pastă de dinți, își va scoate, dacă este cazul, proteza, își va clăti gura în mod repetat și insistent, apoi va tuși, pentru a „rupe din piept" secreția bronhoalveolară, pe care o va elimina într-o cutie Petri curată și sterilă sau (și) într-un borcan, de asemenea, curat și steril cu 200—300 ml apă sau, mai bine, cu soluție Ringer lactozată sau apă peptonată 1% sterilă. O cantitate de 2 ml de secreție bronhoalveolară adevărată (nu de salivă) este suficientă pentru examenele ulterioare.

Decontaminarea. Medicul trebuie să examineze *imediat* produsul expectorat, „pescuind" cu o ansă de platină sau cu o sită cu ochiuri de 1 mm^2, porțiunile cele mai reprezentative, pe care le va spăla (decontaminarea de salivă) prin 3 spălări succesive a cîte 5—10 minute fiecare, în cîte 15—20 ml dintr-una din soluțiile de mai sus. Pentru decontaminare, s-a mai propus ca sputa să fie emisă de-a dreptul pe o sită metalică (ca aceea de strecurat ceaiul) și spălată imediat la jet de apă,

Scanned with OKEN Scanner

sau ca sputa să fie emisă, după cum s-a spus mai sus într-un vas cu 200—300 ml apă (fig. 48).

Controlul primar al produsului (trierea sputelor reprezentative). Produsul bine spălat este etalat pe fundul unei cutii Petri, bine luminat,

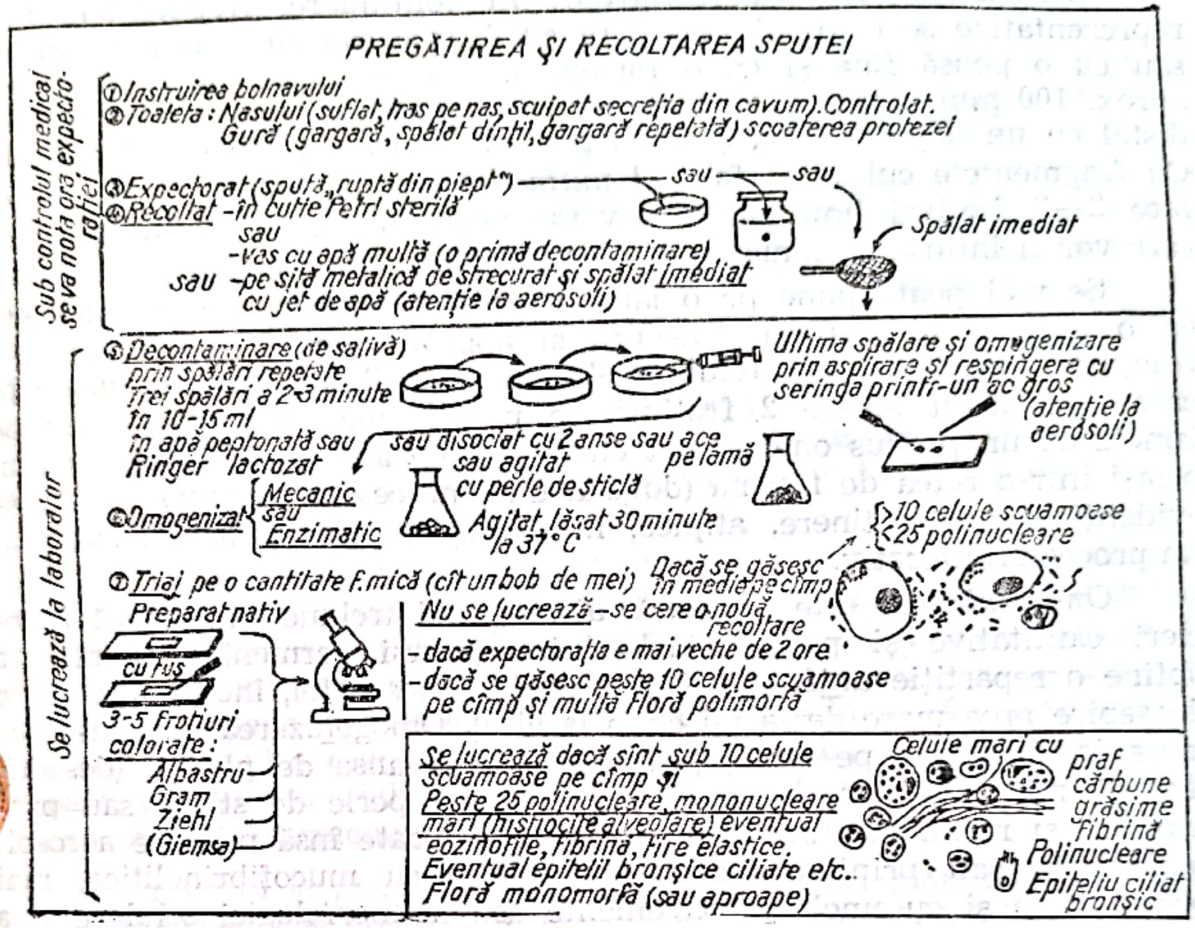


Fig. 48. — Pregătirea şi recoltarea sputei.

şi se examinează pe fond negru cu ochiul liber şi cu lupa de mînă, pentru a distinge diversele elemente, ca: resturi de salivă, mucus, fibrină, sînge, puroi, dopuri bronşice etc. Uneori, se pot vedea granule mici de Actinomyces.

Se aleg, se separă şi se recoltează din porţiunile cele mai reprezentative (porţiuni opace, gălbui sau sanguinolente sau dopuri bronşice) mici porţiuni (cît un bob de mei), care vor fi examinate microscopic, extemporaneu ca preparat umed, proaspăt şi necolorat între lamă şi lamelă, cu obiectivul mic, apoi cu cel mijlociu şi, eventual, şi cu imersia. Acest examen este, în primul rînd, *necesar pentru un triaj al sputelor, în vederea recunoaşterii şi respingerii probelor necorespunzătoare*, care conţin multă salivă şi prea puţine sau deloc elemente inflamatorii, bronşice şi alveolare. Pentru a putea fi luată în considerare, sputa trebuie să aibă cel puţin 25 de leucocite (polinucleare şi mai ales macrofage mari alveolare) şi cel mult 10 celule scuamoase epiteliale plate, în medie, pe cîmp microscopic examinat cu mărire mică (× 100) (fig. 48). Crite-

riile acestea nu sînt valabile la bolnavii cu leucopenii importante. Durata între expectoraţie şi examinare nu trebuie să depăşească 1 oră. Sputele *necorespunzătoare*, din aceste 2 puncte de vedere, *nu se mai prelucrează*, ci se anunţă imediat clinicianul, pentru o nouă recoltare.

2.6.0.0.3. Executarea frotiurilor. În continuare, fragmentele mai reprezentative se culeg şi se separă cu 2 anse sau cu o ansă şi un ac, sau cu o pensă fină şi cu o forfecuţă, sau se aspiră cu o pipetă de aprox. 100 mm lungime, cu gura de 4—5 mm ∅ şi prevăzută la capătul distal cu un dop de vată, şi cu o pară de cauciuc pentru aspiraţie etc. Cu fragmentele culese se fac *cel puţin 4 lame*. Pe fiecare lamă, se pot face 2—3 frotiuri liniare, din diverse porţiuni ale materialului cules, care vor fi întinse pe lamă cu ajutorul ansei de platină.

Se mai poate pune pe o lamă un mic fragment, care se striveşte cu o a doua lamă pusă deasupra şi apoi lamele se separă printr-o tracţiune tangenţială. În felul acesta, se obţin 2 frotiuri. Pe lamele pe care s-au făcut aceste 2 frotiuri, se pot distinge mai bine decît pe lamele cu un produs omogenizat enzimatic, dacă se evidenţiază germeni prinşi într-o reţea de fibrină (dovada unui proces inflamator) şi dacă se evidenţiază celule tinere, atipice, în placarde, care ar indica eventual un proces proliferativ.

Omogenizarea este necesară, atunci cînd trebuie să se facă aprecieri cantitative şi proporţionale între diverşi germeni şi pentru a obţine o repartiţie uniformă a elementelor, în aşa fel, încît să nu fie o deosebire prea mare de la un cîmp la altul. Omogenizarea se poate face mecanic, fie chiar pe lamă, prin frecarea cu ansa de platină (deseori, metodă nesatisfăcătoare), sau într-un vas cu perle de sticlă, sau prin aspirare şi respingere succesive cu seringa (poate însă produce aerosoli periculoşi), sau printr-o tratare enzimatică cu mucofibrinolitice, mai pretenţioasă şi cu unele inconveniente asupra morfologiei celulare şi a vitalităţii unor germeni.

Recoltarea, decontaminarea, alegerea şi separarea porţiunilor mai reprezentative şi apoi eventuala lor omogenizare şi executarea de frotiuri bune, constituie punctele slabe ale execuţiei examenului de spută.

S-au propus diferite tehnici, dar toate mai mult sau mai puţin criticabile. În orice caz, toate acestea trebuie executate rapid, în maximum 1 oră de la expectoraţie, deoarece orice întîrziere compromite valoarea rezultatelor. Chiar şi pentru bacilul Koch, este bine să se lucreze pe mai multe eşantioane proaspete (eventual păstrare la frigider), decît pe sputa de 24 de ore.

2.6.0.0.4. Examenul microscopic al sputei. Este de dorit ca nu numai medicul de laborator clinic, dar şi însuşi clinicianul (în orice caz în cazurile-problemă), să facă chiar el, la început împreună cu medicul specialist de microbiologie clinică, *examenul microscopic al sputei*, şi chiar şi însămînţarea semicantitativă a sputei pe medii de cultură şi reexaminarea culturilor după 24 de ore de incubaţie. În felul acesta, el îşi va da seama de valoarea fiecărei manopere şi de principalele cauze de eroare. În majoritatea cazurilor de infecţii acute ale căilor respiratorii inferioare, se va putea pune, pe baza datelor epidemiologice, clinico-

Scanned with OKEN Scanner

radiologice şi a examenului morfologic microscopic al sputei, corect prelucrată, un diagnostic rapid de prezumţie etiologică, scutind laboratorul central de studii ulterioare laborioase şi costisitoare. La unii bolnavi, însă, precum şi din motive epidemiologice, statistice şi de interes ştiinţific, este necesar să se recurgă la examene de laborator complementare, efectuate de specialiştii de laborator clinic.

Examenul microscopic al preparatului umed permite recunoaşterea următoarelor elemente : *celule scuamoase* epiteliale, mari, plate, din gură (dovada contaminării cu salivă) ; *macrofage alveolare,* cu diametrul de 2—3 ori mai mare ca al polinuclearelor, cu citoplasma plină de granule sau picături amorfe (care maschează nucleul) de praf sau cu hemosiderină în cazul pulmonului cu stază (denumite impropriu „celule cardiace"), dovada unui produs din alveole ; uneori *epitelii bronşice,* intacte sau fragmentate ; *polinucleare,* în procesele inflamatorii ; *eozinofile,* cristale Charcot-Leyden şi spirale Curschman, în astm ; mucus, fibrină (de asemenea, dovada unui proces inflamator) ; *fibre elastice,* în procese parenchimatoase distructive (abces pulmonar) ; hematii ; uneori fungi şi paraziţi (mai ales vizibili, dacă se lasă să difuzeze, între lamă şi lamelă, tuş de China) (vezi fig. 48).

Examenul microscopic al frotiurilor colorate. Din porţiunile mai reprezentative de spută spălată, se fac cel puţin 4 lame cu frotiuri subţiri (eventual, pe aceeaşi lamă, se pot face 2—3 frotiuri înguste din diferite porţiuni ale sputei). Prima lamă se colorează cu *albastru de metilen* şi a doua cu *Gram,* urmînd ca celelalte lame să fie păstrate de rezervă. În multe cazuri, este necesar să se facă şi frotiuri ceva mai groase, colorate cu *Ziehl,* şi frotiuri subţiri, colorate cu *Giemsa* (obligatoriu, în toate suspiciunile de procese proliferative).

De notat că în produsele patologice, coloraţia Gram poate uneori fi înşelătoare, în primul rînd, printr-o coloraţie nereuşită (defect de tehnică), dar şi prin faptul că diferenţierea între bacteriile grampozitive şi negative poate să nu fie destul de clară, ceea ce se întîmplă deseori, dacă coloraţia de fond cu fucsină sau cu safranină a fost prea intensă, sau dacă decolorarea cu alcool-acetonă a fost prea prelungită, sau fiindcă unii germeni, fie prea tineri, fie alteraţi de un tratament antimicrobian anterior, nu au caracterele lor tinctoriale clasice. Una din erorile periculoase este confundarea klebsielelor (diplococobacili gramnegativi încapsulaţi) cu pneumococii (diplococi alungiţi grampozitivi încapsulaţi).

Examenul microscopic trebuie făcut cu răbdare, pe timp de cel puţin 5—10 minute, de fiecare lamă. Întîi, se priveşte cu mărire mică, apoi mijlocie şi, în ultimul rînd, cu imersia. Acest examen este indispensabil pentru aprecierea abundenţei şi varietăţii elementelor (mucus, fibrină, celule, bacterii etc.) ; pentru aprecieri *calitative, semicantitative* şi *aproximativ proporţionale ; citologice* (de ex., proporţia între epitelii, polinucleare, limfocite etc.), *microbiologice* (de ex., între coci şi bacili, între germeni grampozitivi şi gramnegativi) şi *citobacteriologice* (de ex., germeni mulţi şi celule puţine, germeni alipiţi sau fagocitaţi de celule epiteliale sau, dimpotrivă, fagocitaţi de macrofagi sau de polinucleare, bacterii şi celule polinucleare prinse în fibrină etc.).

Pentru studiul bacteriologic al sputei bine spălate, se ia în considerare (cu excepţia bacililor acidoalcoolorezistenţi), în primul rînd (sau

Scanned with OKEN Scanner

chiar numai), *flora abundentă şi net preponderentă,* mai ales dacă este *monomorfă* sau aproape, cu germeni aflaţi liberi într-o reţea de fibrină sau eventual fagocitaţi în polinucleare sau macrofage, deoarece aceştia au cea mai mare valoare pentru diagnostic. (Se va neglija flora polimorfă şi germenii alipiţi sau încorporaţi în celulele scuamoase, deoarece provin din flora bucală şi indică deseori că sputa nu a fost bine decontaminată).

În cazurile cele mai frecvente, în practică, în care nu se poate vorbi de o floră net preponderentă, valoarea diagnostică a sputei este îndoielnică. Bolnavii cu bronşită cronică, dilataţii bronşice, abcese pulmonare deschise de mult în căile respiratorii, intubaţi sau internaţi în secţii de terapie intensivă, pot elimina zilnic cantităţi apreciabile de spută, deseori cu o floră microbiană mixtă. În aceste cazuri urmărirea macroscopică a sputei (cantitate, miros, stratificare, aspect, culoare etc.) este frecvent de mai mare folos decît examenul microscopic. Este greu să se poată stabili, în aceste cazuri, care sînt germenii implicaţi în procesul patologic şi care sînt doar saprofiţi. Se recurge la un examen cultural, care uneori poate evidenţia un hemofil, care ar putea avea un rol etiologic doar în puseurile acute ale bronşitelor cronice.

Deseori, se poate afirma că sputa examinată *nu permite suspiciunea unei anume etiologii* sau cel mult a unor categorii etiologice: infecţii bacteriene sau virale sau neinfecţioasă, alergică.

Lamele cu elemente anormale, greu de recunoscut sau de interpretare îndoielnică pentru examinator (celule posibil neoplazice, paraziţi, fungi etc.), trebuie păstrate şi revăzute de specialişti, care vor cere eventual noi colorataii sau diverse alte tehnici de specialitate.

Citirea corectă a culturilor şi identificarea germenilor trebuie făcută de medici specialişti de microbiologie clinică.

La terminarea etapei de examen microscopic al sputei şi cu ajutorul ei, clinicianul poate, pe baza datelor epidemiologice evolutive ale bolii, ale semnelor clinico-radiologice şi ale probabilităţilor statistice, să facă de obicei un diagnostic de prezumţie, uneori chiar de certitudine. El poate să renunţe sau să ceară, în continuare, alte investigaţii de laborator (de ex., culturi, identificări, antibiograme etc.). El poate să prescrie, eventual, un tratament simptomatic sau unul raţional sau chiar unul etiotrop.

În adevăr, punerea în evidenţă în pneumopatii acute febrile, în sputa *bine spălată* a unei flore cu mare preponderenţă de diplococi (lanceolaţi) grampozitivi încapsulaţi, justifică diagnosticul de *infecţie pneumococică.* Prezenţa de bacili gramnegativi groşi, cu capetele rotunjite şi încapsulaţi, justifică diagnosticul de *infecţie cu Klebsiella,* iar prezenţa de coci grampozitivi în grămezi, justifică diagnosticul de *infecţie cu stafilococi.* Punerea în evidenţă a bacililor acidoalcoolorezistenţi justifică suspiciunea foarte mare, de *tuberculoză.* La copiii sub 4—6 ani, punerea în evidenţă de coccobacili mici gramnegativi, deş în grămezi, justifică suspiciunea de *infecţie cu hemofili,* iar o floră cu numeroşi bacili gramnegativi (coliformi), tot la copii, permite suspiciunea unei *infecţii cu floră enterală.* Punerea în evidenţă de bacili gramnega-

Scanned with OKEN Scanner

tivi coliformi, la bolnavi politrataţi, internaţi mult timp în diferite unităţi sanitare, mai ales acei din secţiile de terapie intensivă, din serviciile de urologie, permite suspiciunea de *infecţie cu Pseudomonas* sau *cu Proteus* sau, eventual, cu alt bacil, foarte probabil rezistent la majoritatea antibioticelor de uz curent.

În relativ multe situaţii, care reprezintă, de obicei, peste 3/4 din cazuri, se poate începe un tratament raţional, deseori etiotrop, cu bune şanse de succes. Alteori, mai trebuie făcute investigaţii suplimentare şi, eventual, se începe cu un tratament simptomatic.

2.6.0.0.5. Examene culturale. Dacă aportul examenului morfologic al sputei este socotit insuficient, se procedează la *însămînţarea cu dispersie semicantitativă a sputei* (pe 4 sectoare ale fiecărei cutii Petri). Se fac *cel puţin 2 plăci,* una cu geloză-sînge proaspăt şi alte cu geloză-sînge şocolată (vezi şi *2.5.* „Examenul exsudatului faringian") (vezi şi fig. 46 şi 47). Eventual, se mai însămînţează o placă cu un mediu diferenţial pentru germeni coliformi (de ex., Mac Conkey sau geloză lactozată), un mediu pentru fungi (de ex., Sabouraud), un mediu pentru bacili Koch (Löwenstein-Jensen), un mediu pentru Bordetella (Bordet-Gengou), în suspiciune de tuse convulsivă etc.

Pentru cercetarea prezenţei bacilului Koch, se recurge şi la *procedee de îmbogăţire* (omogenizare, decontaminare de flora însoţitoare, flotaţie sau centrifugare şi apoi examinarea microscopică sau/şi însămînţare pe mediul Löwenstein-Yensen). Simpla baciloscopie evidenţiază doar 30—40% din sputele bacilifere diagnosticate cultural (vezi şi cap. *3.2.1.8.*).

Toate aceste manopere, precum şi etapele ulterioare, pentru punerea în evidenţă a multiplilor agenţi etiologici, care pot fi evidenţiaţi în spută, folosirea de medii speciale, de diferite feluri de incubare (în aerobioză, în atmosferă cu CO_2, în anaerobioză), izolarea şi identificarea diferiţilor agenţi (bacterieni, micotici, paraziţi sau chlamidii, micoplasme, rickettsii, virusuri), cad în sarcina laboratoarelor centrale, laboratoarelor C.S.A. sau laboratoarelor de profil. Medicii de laborator vor folosi indicaţiile date în „Metode de laborator de uz curent" vol. II (Ministerul Sănătăţii şi Academia de Ştiinţe Medicale, Ed. medicală, 1977), tehnici standardizate, şi în diversele manuale apărute în ultimii ani.

În privinţa *antibiogramelor*, ele se efectuează la cererea clinicianului sau, de rutină, în scopuri statistice, epidemiologice sau de cercetare.

Folosirea mecanică, fără discernămînt, a rezultatelor antibiogramei, în aplicarea unui tratament cu antibiotice, poate fi dezamăgitoare, în multe cazuri, şi chiar dăunătoare, prin selecţia de germeni rezistenţi, apariţia de efecte adverse şi risipă de medicamente.

2.7. LICHIDUL GASTRODUODENAL

Lichidul gastric normal, recoltat dimineaţa pe nemîncate, este puternic acid (pH = 0,9—1) şi fără germeni viabili, dar deseori cu germeni vizibili din nazofarinx şi salivă. Pot supravieţui doar unii bacili acidorezistenţi, fungi şi bacterii sporulate.

Scanned with OKEN Scanner

La bolnavii cu anaciditate, cu stază gastrică sau cu neoplasm gastric, cavitatea gastrică poate fi populată de un număr mare şi variat de germeni ingeraţi (proveniţi din alimente sau înghiţiţi odată cu saliva). În gastritele microbiene (gastrita flegmonoasă, foarte rară), se evidenţiază bacterii, fungi, celule epiteliale normale şi leucocite, care indică un proces infecţios.

La copii şi la femei, cu suspiciunea de tuberculoză pulmonară şi care nu expectorează, ci înghit sputa, se recomandă examenul sucului gastric pentru cercetarea bacilului Koch, ţinînd seama însă că aici se pot găsi şi bacili acidoalcoolo-rezistenţi nepatogeni, proveniţi din alimente sau apă.

2.7.0.0.1. Tehnica de recoltare şi prelucrarea sucului gastric. Bolnavul, nemîncat de 12 ore, face o toaletă a gurii, i se introduce apoi în stomac o sondă sterilă. Se aspiră lichidul de stază, dacă există, sau se spală cavitatea gastrică cu 100—200 ml apă distilată sterilă, care se aspiră imediat. Se controlează pH-ul ; se centrifughează lichidul timp de 30 de minute la 3 000 turaţii/minut şi se fac frotiuri din sediment, care se examinează microscopic după colorarea cu Gram şi cu Ziehl (fig. 49). Pentru evidenţierea bacililor Koch, se amestecă sedimentul cu aprox. 10 ml NaOH 4 g/100 ml apă, se agită, se lasă o jumătate de oră la 20—35°C, pentru omogenizare şi decontaminare, apoi se neutralizează cu o soluţie normală de HCl şi se centrifughează o jumătate de oră la 3 000 turaţii/minut. Din sediment, se fac frotiuri, care se colorează cu Ziehl, şi se fac culturi pe mediul Löwenstein, pentru identificarea ulterioară a bacililor acidoalcoolorezistenţi.

2.7.0.0.2. Tubajul duodenal se face, de obicei, pentru decelarea infecţiilor biliare. Lichidul duodenal este însă un amestec de lichid gastric, secreţii duodenale, secreţii pancreatice şi bilă. Are un pH

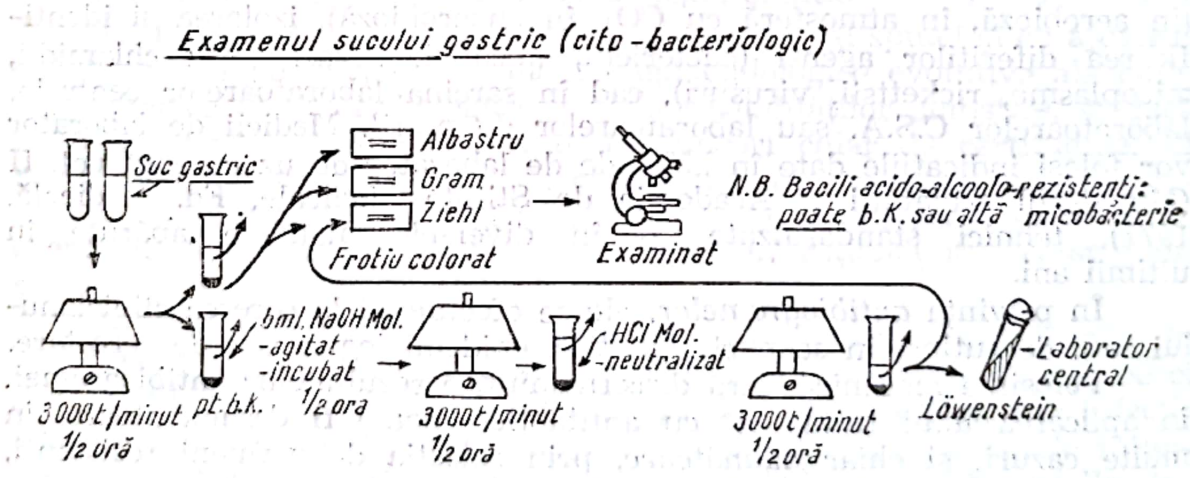


Fig. 49. — Examenul citobacteriologic al sucului gastric.

alcalin şi poate conţine celule epiteliale descuamate, iar în cazul infecţiilor, şi leucocite. Din cauza fermenţilor digestivi din lichidul duodenal, celulele ce se pot afla acolo, în special celule epiteliale, suferă repede modificări morfologice, constînd dintr-o ratatinare celulară cu nuclei în kariorexis sau liză, ceea ce fac de nerecunoscut sau de confundat cu

Scanned with OKEN Scanner

leucocite, putînd chiar simula un fals proces inflamator. Din această cauză, sedimentul centrifugat al lichidului duodenal trebuie examinat microscopic, imediat după recoltare, sau cel mult după un 1/4—1/2 de oră (unii autori recomandă amestecul imediat al lichidului duodenal cu un lichid fixator).

În mod normal, lichidul duodenal nu conține germeni, exceptînd pe cei proveniți, eventual, intermitent din stomac. În stări patologice, însă, se pot evidenția în duoden, pe lîngă mucus și celule, o serie de bacterii, de paraziți, de fungi, vii sau morți, aerobi și anaerobi, proveniți din intestin, din stomac, mai rar din căile pancreatice, dar mult mai des din căile biliare. Pentru lămurirea, pe cît posibil, a acestor diferite posibilități, se vor respecta pe rînd etapele indicate în tehnica de mai jos.

Tehnica recoltării și prelucrării lichidului duodenal. Tehnica este la început aceeași ca pentru tubajul gastric. Prin sonda ajunsă în stomac, se recoltează un eșantion de suc gastric, pentru determinarea pH-ului și pentru a aprecia dacă există acolo germeni, aspectul și abundența lor. La nevoie, se pot face culturi pe medii aerobe și anaerobe, pentru aprecierea viabilității și condițiilor de viabilitate a acestor germeni.

În continuare, se trece (uneori, greu și cu multă răbdare) sonda în duoden. Se recoltează și din duoden un eșantion, în care se vor repeta investigațiile de mai sus. Dacă (ceea ce se întîmplă deseori) nu se poate scoate lichid din duoden, se face o mică spălătură duodenală cu aprox. 10 ml de apă distilată sterilă, care va fi reaspirată și din care se vor face frotiuri și, eventual, culturi din sedimentul de centrifugare. Dacă lichidul extras în aceste condiții este tulbure și foarte încărcat, se introduc pe sondă 100—200 ml de apă rece distilată sterilă, pentru spălarea duodenală. Numai apoi, după ce medicul s-a asigurat de imposibilitatea sau de posibilitatea și de gradul posibil de contaminare a bilei cu o floră gastroduodenală, se introduc pe sondă 30—50 ml de soluție 40 g/100 ml sulfat de magneziu steril, încălzit la 30—37°C. Se pensează sonda și, după 5—10 minute, se începe recoltarea lichidului, care se scurge într-o serie de tuburi sterile. Prima porțiune de 10—30 ml este, de obicei, de culoare galbenă, limpede sau uneori ușor opalescentă și constituie porțiunea denumită bila A (lichid duodenal și bilă coledociană). După 15—25 de minute, se scurge de obicei o cantitate variabilă, dar nu peste 100—200 ml, dintr-un lichid mai vîscos, brun-castaniu, închis la culoare, care reprezintă bila B „veziculară". În continuare, lichidul care se scurge, uneori timp îndelungat, este galben deschis și reprezintă bila C „hepatică". Aceste 3 feluri de bilă, care în mod normal sînt perfect limpezi, în stări patologice pot fi opalescente, cu mucus sau chiar net tulburi sau purulente. Din fiecare „bilă", se fac frotiuri din sedimentul de centrifugă, care se examinează microscopic cu obiective uscate și, apoi, după colorarea frotiurilor cu albastru de metilen, cu Gram (și cu Ziehl), se examinează cu obiectiv uscat, apoi cu imersie. Din fiecare bilă (A, B și C), care

Scanned with OKEN Scanner

conţine bacterii vizibile în sediment şi leucocite, în afară de mucus şi săruri biliare, se fac culturi pe diferite medii de cultură şi se folosesc totdeauna cel puţin o geloză-sînge şi un mediu uşor selectiv şi diferenţial (de tipul Mac Conkey). La acestea, se poate adăuga un mediu lichid selectiv, pentru izolarea de salmonele (de ex., bacil tific) şi, la nevoie, şi medii pentru anaerobi. Este foarte bine ca biliculturile să se facă după una din tehnicile semnificative descrise pentru urocultură. Un număr mai mare de 10^5 bacterii/ml pledează pentru o infecţie, iar sub 10^3 este des nesemnificativă (fig. 50).

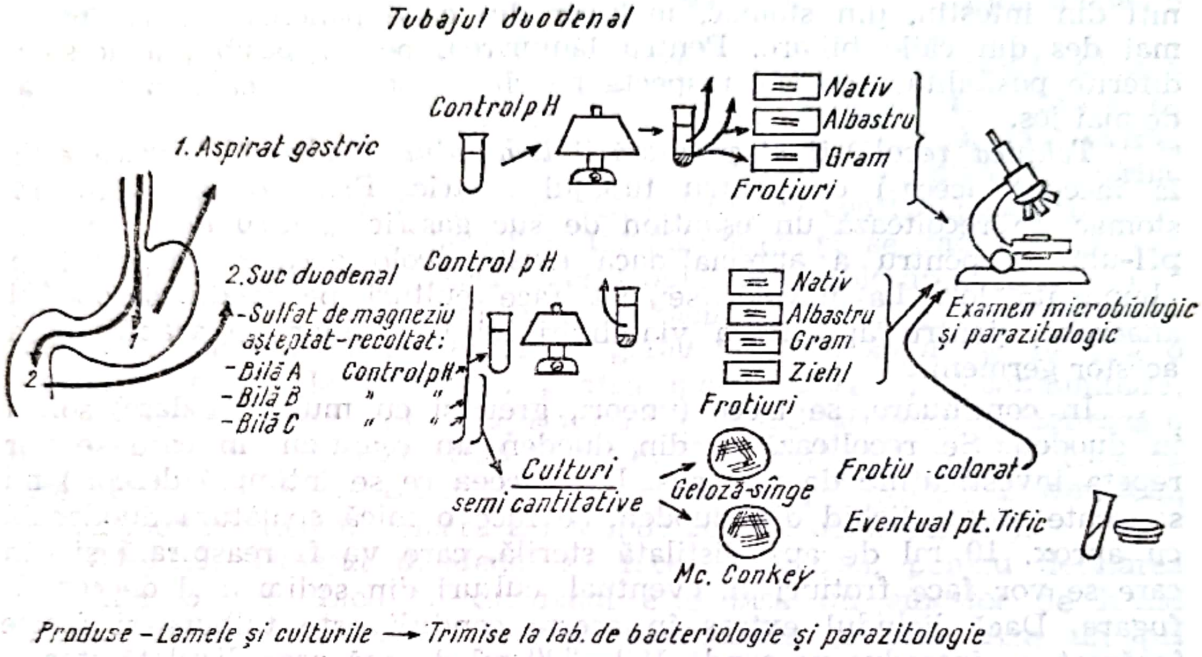


Fig. 50. — Tubajul duodenal. Se va compara cantitativ, calitativ şi ecologia florei între aspiratul gastric şi sucul duodenal, ca şi între diferitele probe de bilă (A, B şi C). Interpretarea trebuie făcută cu multă prudenţă.

În bilă, se pot evidenţia diferiţi *microbi:* bacterii gramnegative de origine intestinală, coci grampozitivi (enterococi şi alţii), precum şi diverşi *paraziţi* adulţi, helminţi sau protozoare, larve sau ouă (Giardia lamblia, Strongyloides, Anchilostoma, Fasciola hepatica), *amibe* şi, uneori, se pot vedea cîrlige sau vezicule-fiice sau porţiuni mici şi fragmentate de *chist hidatic.*

Ascarizii pot ajunge, uneori, în duoden şi chiar în căile biliare, dar din cauza dimensiunilor lor relativ mari, nu se lasă extraşi prin tubaj duodenal.

Relativ frecvent, în sedimentul colorat din bilă, se evidenţiază un număr variabil de bacterii, în timp ce bilicultura rămîne „sterilă". Fie este vorba de bacterii neviabile, trecute prin stomac, fie este vorba de bacterii anaerobe, care nu pot fi cultivate decît în condiţii speciale de anaerobioză. În afară de bacterii şi de paraziţi, se mai pot evidenţia levuri, în special Candida. Examenul bacteriologic şi parazitologic sumar (vezi *2.8.* „Coprocultura şi examenul coproparazitologic"), trebuie

completat neapărat de un examen al bilei şi al scaunului, făcut de specialiştii de laborator de bacteriologie şi parazitologie, mai ales dacă acel care examinează are îndoieli asupra identităţii formaţiunilor observate.

2.8. MATERIILE FECALE. COPROCULTURI ŞI EXAMENUL COPROPARAZITOLOGIC

Examenele coprobacteriologic şi coproparazitologic trebuie încredinţate specialiştilor de laborator clinic. Scaunul conţine, în mod normal, un număr imens de germeni din numeroase specii aerobe şi mai ales anaerobe, care în general predomină faţă de germenii patogeni, eventual supraadăugaţi. Aceştia din urmă pot face parte din specii foarte diferite, aşa încît izolarea, identificarea, precum şi recunoaşterea rolului patogen al unui anume germen condiţionat patogen, reprezintă etape foarte dificile, necesitînd numeroase şi variate tehnici de laborator, care nu pot fi la îndemîna clinicianului şi nici chiar a multor laboratoare de spital sau de policlinică.

Colaborarea între clinică şi laborator este însă de mare importanţă, deoarece — pe baza datelor epidemiologice şi clinice — se poate, de cele mai multe ori, indica agentul patogen probabil şi înlătura o serie de alte etiologii, teoretic posibile. Aceasta permite, de la început, o orientare mai eficace a cercetărilor de laborator, cu restrîngerea raţională a domeniilor de investigaţie practică.

Este drept însă că, în cercetări epidemiologice, în unele tulburări digestive, în focare mari de toxiinfecţii alimentare, sau de diferite diarei acute etc., laboratorul este, uneori, pus în situaţia să facă cercetări ample şi variate, pentru depistarea agentului etiologic în cauză, care poate face parte din multe specii bacteriene, parazitare, micotice sau virale, sau poate fi o substanţă toxică.

2.8.0.0.1. Prima acţiune este aceea *de încadrare epidemiologică şi clinică a cazului.* Într-adevăr, marea majoritate a infecţiilor digestive se pot încadra în cîteva tablouri epidemiologice şi clinice, care sugerează anumiţi agenţi patogeni specifici şi care orientează analizele ulterioare. Pe cît posibil, analizele vor fi făcute înainte ca bolnavul să fi primit antibiotice sau chimioterapice. Principalele *tablouri clinice* sînt următoarele :

2.8.0.0.1.1. Gastroenterocolite acute. Acestea sînt legate mai ales de ingerarea unor alimente contaminate. Apar sporadic sau în izbucniri epidemice, manifestate cu vărsături şi diaree apoasă, fecaloidă uneori bilioasă ; sugerează infecţii cu specii de *Salmonella,* poate cu *rotaviruşuri,* mai rar cu *stafilococ enterotoxic, E. coli* enteropatogen neinvaziv, *E. coli* enterotoxigen sau excepţional cu *Yersinia enterocolitica, Vibrio parahaemolyticus* şi alţii aerobi sau anaerobi (Clostridium perfringens etc.). Un aliment puternic contaminat, cu aproape indiferent ce germen, dacă numărătoarea germenilor depăşeşte cîteva milioane/gram de aliment, poate produce tulburări digestive acute. Cele mai multe din aceste diarei sînt de tipul patogenic neinvaziv, enterotoxinic, exsudativ sau

secretor, în care agenţii infecţioşi nu pătrund în mucoasă şi la examenul citobacteriologic polinuclearele lipsesc sau sînt foarte puţine. Aceeaşi simptomatologie poate fi produsă de diferite substanţe toxice. În toate aceste cazuri, este obligatoriu să se execute analiza alimentelor incriminate, a vărsăturilor şi a scaunului emis spontan sau recoltat cu tamponul rectal. Indiferent de etiologie, tratamentul de urgenţă este centrat pe reechilibrarea hidroelectrolitică, pe tratamentul simptomatic şi reluarea alimentaţiei. Antibioticoterapia este, deseori, inutilă sau chiar dăunătoare, din cauza perturbărilor ecologice, pe care le produce. Lipsa polinuclearelor la examenul coprocitologic îndreaptă de obicei diagnosticul către o diaree acută.

2.8.0.0.1.2. Febrele enterice. Produc alterarea stării generale, cu leziuni intestinale ulcerative, care pot duce la hemoragii şi perforaţii ; la început, evoluează, de obicei, cu o simptomatologie digestivă minimă sau necaracteristică. Se produce o pătrundere a bacteriilor în peretele intestinal cu ulceraţii, apoi o diseminare limfatică şi o diseminare hematogenă, eventual cu diferite localizări şi eliminări de germeni (bilă, urină). Apar anticorpi specifici. Boala este, de regulă, ciclică şi urmată de o stare de imunitate. Ea sugerează o infecţie cu bacili tifici, sau cu bacili paratifici A, mai rar cu paratifici B şi, excepţional, cu paratifici C. Este obligatorie efectuarea de coproculturi, hemoculturi şi uroculturi (eventual biliculturi, meduloculturi etc.) şi cercetări serologice.

2.8.0.0.1.3. Infecţiile septicemice, eventual cu metastaze diverse, au o evoluţie severă, de obicei neprevizibilă. Această formă este determinată, deseori, de salmonele din grupul C (eventual S. enteritidis). Se efectuează coproculturi, hemoculturi, culturi din metastazele accesibile şi cercetări serologice.

2.8.0.0.1.4. Dizenterii. Sînt boli caracterizate prin scaune foarte numeroase, compuse din mucus, puroi, sînge, fără materii fecale şi însoţite de tenesme rectale. De obicei, sînt produse de specii de Shigella, mai rar de alţi germeni (E. coli enteropatogen invaziv, Vibrio parahaemolyticus, salmonele). În regim cald, sînt des produse de amibe. Aceşti germeni pătrund în mucoasă, pe care o ulcerează, ceea ce duce la apariţia în scaun de polinucleare şi hematii.

Obligatoriu, se fac coproculturi, examen coprocitologic şi un examen coproparazitologic din scaunul proaspăt emis. Recoltările se fac cu tamponul din rect, în cazurile acute, sau din ulceraţiile descoperite la rectoscopie.

2.8.0.0.1.5. Enterite acute foarte grave, cu deshidratare marcată, scaune apoase fără fecale cu mici flocoane de fibrină (ca apa în care a fiert orezul, denumite impropriu „riziforme") sugerează *holera.* Sindromul poate fi, însă, pricinuit uneori şi de alţi germeni (de ex., de specii de Salmonella în „cholera nostras"). Obligatoriu şi foarte urgent, se fac coproculturi de către laboratoarele C.S.A., deoarece diagnosticul bacteriologic este de mare interes epidemiologic. Terapia, cu mult cea mai importantă, însă este aceea de reechilibrare hidroelectrolitică, singura care poate salva bolnavul. Deşi există antibiotice şi chimioterapice foarte active faţă de vibrionii holerici, acestea singure nu pot

Scanned with OKEN Scanner

duce la vindecarea bolnavului, ci doar la grăbirea eliminării vibrionilor din scaun și uneori la scurtarea duratei diareei.

2.8.0.0.1.6. Diarei apărute după administrarea de antibiotice. Acestea apar, mai ales după administrarea orală, de antibiotice cu spectru larg. Sugerează infecții cu : stafilococi, proteus, piocianic, colibacili, Clostridium difficile etc. sau Candida. În aceste cazuri, examenul microscopic al scaunului nativ, între lamă și lamelă, și frotiul colorat cu Gram constituie, deseori, singurul mijloc de a pune un diagnostic corect și rapid.

2.8.0.0.1.7. Intoxicația botulinică este sugerată de fenomene nervoase, asemănătoare la început cu intoxicația cu atropină (midriază, uscăciunea gurii, constipație), urmate apoi de paralizii oculare, tulburări de deglutiție și respiratorii, mai ales în anumite contexte epidemiologice (ingestie de conserve de legume, pește, cîrnați), uneori precedate de tulburări digestive minore. În vărsături, în materii fecale și în sînge, se cercetează prezența toxinei botulinice de tip A, B, E (mai rar intervin alte tipuri), în laboratoare de specialitate (de ex., Institutul Cantacuzino).

2.8.0.0.1.8. Alte diarei. La convalescenți sau la persoane suspectate de a fi purtătoare de germeni patogeni și la persoane bănuite de *infecții parazitare,* deseori asimptomatice sau cu manifestări necaracteristice, trebuie prelucrate la laborator cantități relativ mari de scaun (2—5 g), obținut spontan sau după un purgativ.

Pe lîngă infecțiile digesive cu germeni patogeni specifici, se pot produce și îmbolnăviri cu germeni *condiționat patogeni.*

La sugari și la copii mici (sub 2 ani), izbucniri epidemice de tulburări acute diareice pot fi produse de tulpini de E. coli enteropatogen (unele tulpini pot fi special de agresive, ca de ex. E. coli 0124B17, care poate fi patogen și pentru adult).

Tulburări acute digestive produse de E. coli enteropatogen, și mai ales de E. coli enterotoxigeni pot să apară la bătrîni, cașectici, imundeprimați, la bolnavi cu neoplasme.

La persoane care au primit antibiotice cu spectru larg (de ex., tetraciclină), pot să apară enterocolite, uneori pseudomembranoase cu *Staphylococcus aureus coagulazopozitiv* sau cu *Candida albicans.* Acești germeni se pot găsi în mod normal în scaun, dar într-o proporție mică față de restul florei intestinale. Pentru a putea fi incriminați stafilococii ca agenți etiologici, trebuie ca la examenul microscopic cocii grampozitivi în grămezi să reprezinte flora preponderentă din scaunul diareic și ca stafilococii coagulazopozitivi să crească în mod preponderent pe geloza-sînge, pe care s-a epuizat o probă de scaun (unele tulpini de stafilococ cresc bine pe geloză-sînge simplă, dar nu pe mediu hipersărat).

Aceeași observație, privind abundența în scaun a fungului *Candida albicans,* prezentă nu numai sub forma unor levuri izolate, care pot fi evidențiate și în scaunul normal, dar și sub formă filamentoasă. Coexistența de fenomene clinice bucale, anale și perianale, sprijină în plus diagnosticul de candidoză.

Tulburările digestive acute (toxiinfecții alimentare, gastroenterite, enterite acute, diaree) pot fi pricinuite și de o serie de germeni opor-

Scanned with OKEN Scanner

tunişti, proveniţi din însăşi flora intestinală saprofită (Proteus, Klebsiella, Pseudomonas etc.). Rolul lor patogenic poate fi bănuit numai în lipsa unor germeni patogeni specifici şi dacă constituie flora masiv preponderentă, mai ales dacă au unele caractere (serologice, fagice sau de sensibilitate la antibiotice), diferite de acelea de restul florei normale a individului şi se regăsesc aceleaşi în scaun, în vărsături şi în alimentele ingerate înainte de îmbolnăvire.

În fine, unele tulburări digestive diareice, mai ales la copii pot fi pricinuite de paraziţi şi de o serie de virusuri a căror izolare şi identificare cade în sarcina laboratoarelor de profil.

2.8.0.0.2. Recoltarea constituie *a doua acţiune*, urmată apoi de *transportul* materiilor fecale la laborator.

Timpul care se scurge între emiterea scaunului, recoltarea şi transportul, pe de o parte, şi prelucrarea lui în laborator, pe de altă parte, are o deosebită importanţă. Temporizarea transportului şi a însămînţărilor după recoltare şi executarea acestora în mod defectuos compromite rezultatul şi poate face inutilă toată cheltuiala de muncă, de timp şi de materiale, care se face ulterior în laborator. Avînd în vedere importanţa acestor acţiuni, ele nu trebuie lăsate pur şi simplu în seama unui personal necalificat, neconştiincios sau chiar pe seama bolnavului. Aceste acţiuni trebuie mereu controlate atît de către un clinician, cît şi de un personal de laborator bine calificat şi conştiincios.

Din cauza unor dificultăţi organizatorice, datorate fie distanţei eventual mari dintre laborator şi bolnav, fie unei lipse de personal calificat, fie altor cauze, se adoptă una din următoarele soluţii :

— Recoltarea se face din *scaunul emis spontan*, iar *prelucrarea se face imediat* („cald") la laborator. Aceasta constituie soluţia ideală atît pentru cercetări bacteriologice, cît şi parazitare, deoarece permite un prim examen macroscopic al scaunului, cu prelevări din porţiunile cele mai reprezentative (mucopurulente, fibrinoase, sanguinolente, lichide etc.). În funcţie de felul examenului necesar (bacteriologic sau parazitar), se pot preleva porţiuni mai mici sau mai mari de scaun. Această atitudine nu este întotdeauna posibilă, deoarece bolnavul poate defeca la intervale mari, eventual noaptea, sau cînd laboratorul nu lucrează.

— Pentru examenul bacteriologic, o soluţie de compromis este aceea de a recolta din scaunul emis spontan şi de a trimite la laborator o porţiune într-un *conţinător special*, eventual cu *un mediu de conservare* (de tip Stuard, Casy-Blair sau tampon fosfaţi 0,033 ml, în părţi egale cu glicerină) ; în lipsă, se menţine la rece (+4°C), pentru a putea fi prelucrat mai tîrziu.

— Recoltarea se poate face cu un *tampon montat* (ca pentru prelevări din faringe) sau (mai puţin bine) cu o sondă Nélaton *direct din rect*, ceea ce se poate executa oricînd. La sugar, se recoltează de pe scutec, în prealabil sterilizat. Acest procedeu este mult mai comod, uşurează munca în laborator, recoltările făcîndu-se la ora fixată de laborator, iar rezultatele bacteriologice sînt mai fidele. Tamponul este descărcat prin agitare într-un tub sau într-o sticluţă sterilă cu 1—3 ml apă sau bulion steril, din care se fac imediat însămînţări pe medii

solide sau/și lichide. Dacă prelucrarea nu se poate face imediat, tubul sau sticluța care conține suspensia de fecale într-un mediu de conservare, este închis ermetic (eventual, cu un dop de cauciuc sau cu un capac cu ghivent).

În rectocolita ulceroasă, ca și în dizenteria subacută sau cronică, recoltarea se poate face cu tamponul de la nivelul ulcerațiilor, în cursul unui examen rectoscopic.

În cazurile în care agenții patogeni bacterieni și parazitari sînt în număr mai mic (convalescenți, purtători cronici, unele infecții parazitare), este necesar să se prelucreze o cantitate mai mare de fecale, folosind la nevoie tehnici de concentrare și îmbogățire.

— Recoltarea pentru cercetarea *oxiurilor* (Enterobius vermicularis) prezintă unele particularități, deoarece sînt foarte rar vizibili cu ochiul liber în scaun sau în regiunea anală, unde femelele își depun ouăle în timpul nopții. Recoltarea pentru ouă (și oxiuri) se face din regiunea anală și din pliurile anale, iar pentru ouă, la copii, și de sub unghii, deoarece ei se pot scărpina în timpul nopții în regiunea anală pruriginoasă, recoltînd astfel ouă. Pentru recoltare, se folosește de obicei următoarea tehnică: dimineața, înainte de defecare și de toaletă, se aplică pe regiunea anală și pe pliurile anale, o bandă adezivă transparentă („scotch"), de care vor adera ouăle; banda este aplicată apoi pe o lamă portobiect, pe care se pot pune în prealabil 1—2 picături de xilol sau de glicerină pentru clarificare. Se examinează lama la microscop. Pentru manipulare, banda adezivă este montată pe o lamă portobiect într-un mod deosebit (fig. 51). În lipsa bandei adezive, se poate

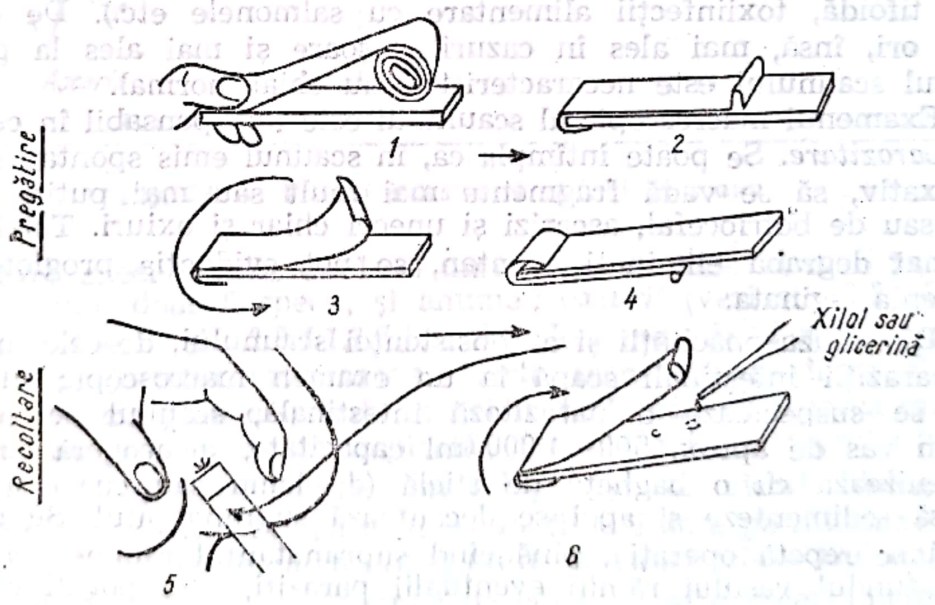


Fig. 51. — Recoltarea pe bandă adezivă (scotch) *pentru oxiuri:* *1* — se acoperă capătul lamei și, apoi, se lipește banda pe fața lamei pe cca 4—5 cm, cu partea lipicioasă pe lamă; *2* — se îndoaie capătul bandei, pentru a putea fi manipulată mai ușor; *3* și *4* — se întoarce pe dosul lamei, cu fața lipicioasă în afară; *5* — se aplică partea lipicioasă pe regiunea perianală; *6* — se pun pe lamă 1—2 picături de xilol sau de glicerină (pentru clarificare), apoi se reaplică banda, ca la punctul *2*. Se examinează la microscop.

recolta cu un tampon montat acoperit cu o foaie de celofan, umezit ușor prin muiere în apă imediat înainte de aplicare. După recoltare, se taie o bucată din celofanul venit în contact cu regiunea anală și se aplică cu fața în jos cu ajutorul unei pense pe o lamă portobiect, pentru a fi examinată microscopic. Cu acest procedeu, în afară de oxiuri, se pot pune în evidență uneori și proglotele de Taenia saginata, care se elimină spontan, grație unor mișcări proprii.

2.8.0.0.3. Tehnica examenului coprologic bacteriologic și parazitar. După cum s-a semnalat mai sus, ancheta epidemiologică, vîrsta bolnavului, condițiile de apariție a bolii și manifestările prezentate de bolnav permit, de cele mai multe ori, chiar de la început, unele suspiciuni etiologice și limitarea cercetărilor, a tehnicilor de executat și a mediilor de cultură. Din această cauză, este foarte important să se comunice laboratorului diagnosticul prezumtiv clinico-epidemiologic, precum și analiza solicitată din scaunul trimis.

Avînd în vedere profilul prezentei lucrări, vom trece în revistă doar ceea ce trebuie să fie în atenția clinicianului și ceea ce ar putea el, eventual, să execute cu mijloace minimale, și anume : *examenul macroscopic*, eventual și cu lupa ; *examenul microscopic*, pe preparatul proaspăt cu obiective uscate și examenul cu obiectivul cu imersie pe preparate colorate cu Gram. Este util clinicianului să știe cum să facă o *însămînțare corectă*, pe cîteva medii uzuale, și *să știe cum să examineze și să interpreteze culturile primare*. De asemenea, este bine să cunoască cîteva *tehnici elementare de parazitologie*.

2.8.0.0.3.1. Examenul macroscopic al scaunului poate fi caracteristic pentru unele boli bacteriene în formele lor grave (holeră, dizenterie, febră tifoidă, toxiinfecții alimentare cu salmonele etc.). De cele mai multe ori, însă, mai ales în cazurile ușoare și mai ales la purtători, aspectul scaunului este necaracteristic sau chiar normal.

Examenul macroscopic al scaunului este indispensabil în cercetările *coproparazitare*. Se poate întîmpla ca, în scaunul emis spontan sau după un laxativ, să se vadă fragmente mai mult sau mai puțin lungi de tenie sau de botriocefal, ascarizi și uneori chiar și oxiuri. Tot în scaun, sau mai degrabă eliminați spontan, se pot evidenția proglote izolate de Taenia saginata.

Din cauza opacității și a consistenței scaunului, de cele mai multe ori, paraziții intestinali scapă la un examen macroscopic superficial. Dacă se suspectează o parazitoză intestinală, scaunul se recoltează într-un vas de aprox. 500—1 000 ml capacitate, se acoperă cu apă, se omogenizează cu o baghetă de sticlă (de lemn sau cu o sîrmă), se lasă să sedimenteze și apoi se decantează supranatantul. Se readaugă apă și se repetă operația, pînă cînd supranatantul rămîne transparent și pe fundul vasului rămîn eventualii paraziți, care pot fi examinați direct sau după ce au fost transferați într-o cutie Petri. Operația trebuie făcută, evitînd posibilitățile de infestare.

Identificarea paraziților trebuie făcută ținînd seama de dimensiunile și de forma lor. Uneori, se pot evidenția în scaun, mai ales la bolnavi cu colon iritabil, filamente de fibrină, mucus și false membrane fibrinoase, care pot simula paraziți.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre paraziții vizibili macroscopic în fecale (vezi și *3.2.4.1.1.*), citățm (la noi în țară) 3 specii mari de mai mulți centimetri lungime : *teniile* (vezi și *3.2.4.1.1.5.*), panglici de mai mulți centimetri sau chiar zeci de centimetri lungime, sau proglote izolate de 1—2 cm de culoare albicioasă lăptoasă ; *botriocefalul* (vezi și *3.2.4.1.1.6.*), tot sub formă de panglici, dar cu proglote mai mici și mai late decît înalte, de asemenea de culoare albicioasă lăptoasă ; *ascarizii* (vezi și *3.2.4.1.1.1.*), de 10—20 cm lungime, cilindrici, cu capetele subțiate, de culoare alb-lăptoasă sau roză (fig. 52).

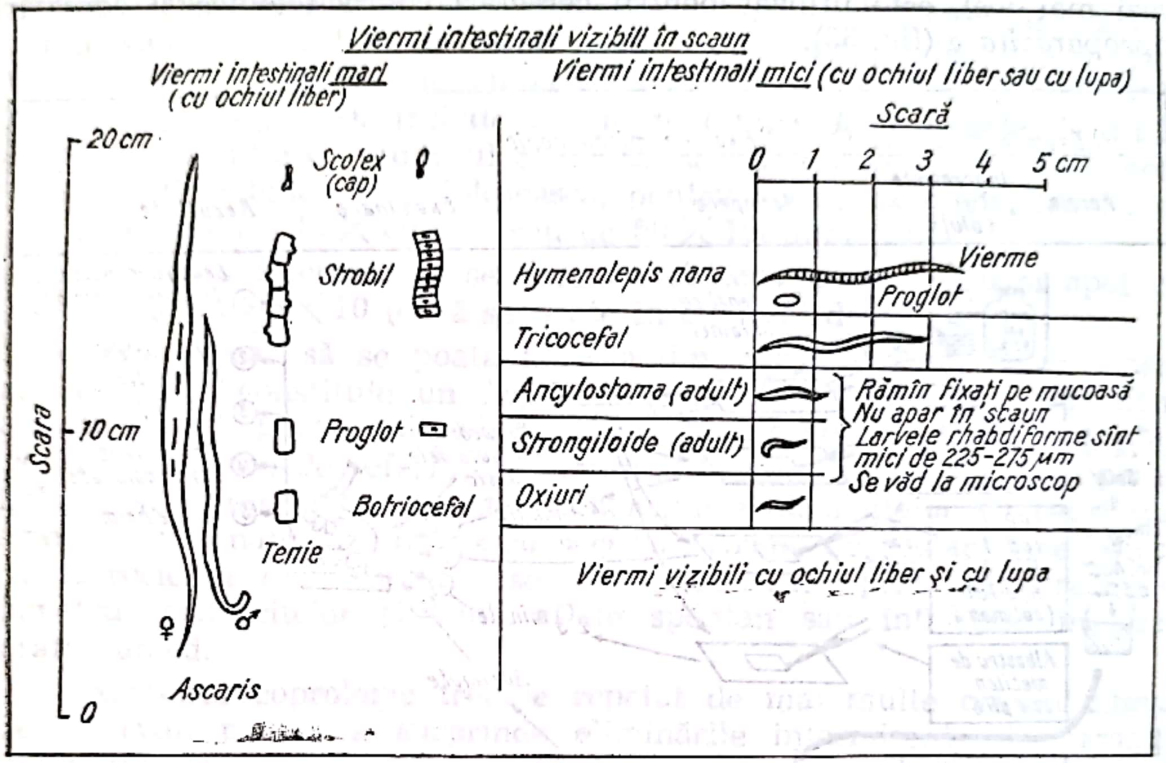


Fig. 52. — Viermi intestinali vizibili în scaun.

Printre speciile mici de 1—3 mm lungime, bine vizibile în fecale cu lupa, citățm doar 5 specii, și anume : *oxiurii* (vezi și *3.2.4.1.1.3.*) ; *tricocefalul* (vezi și *3.2.4.1.1.7.*) ; *Ancylostoma duodenale* (vezi și *3.2.4.1.1.2.*) și *Necator americanus,* foarte asemănătoare între ele, dar dintre care prima pare dispărută la noi în țară prin igienizarea minelor, iar a doua de preponderență tropicală ; *Strongyloides stercoralis* (vezi și *3.2.4.1.1.4.*), foarte asemănător morfologic și la ciclul biologic cu Ancylostoma, dar care nu apare în scaun fiind fixată pe mucoasa intestinală, apar însă larvele rabdiforme, mult mai mici (100—300 μm), care pot fi puse în evidență prin tehnici de cultivare și examen microscopic (fig. 52) ; *Trichinella spiralis* (vezi și *3.2.4.1.2.1.*), numai în primele zile de la infestare.

Se mai pot evidenția în fecale paraziți (larve și ouă), proveniți de la animale, de regulă fără rol patogen pentru om. Persoanele care au trăit în țări calde sînt des parazitate (uneori masiv), cu o serie de

paraziți exotici, care de obicei pot fi identificați corect numai de specialiști.

Avînd în vedere aspectele înșelătoare, numărul mare de specii de paraziți, de larve și de ouă, care pot fi evidențiați în scaun (fie paraziți ai tubului digestiv uman, fie „de trecere", ingerați odată cu alimentele), recomandăm călduros ca fiecare formațiune suspectă să fie examinată neapărat și de un specialist, pentru a se face o identificare corectă.

2.8.0.0.3.2. Examenul microscopic între lamă și lamelă al scaunului. Scaunul nativ, omogenizat, tratat cu ser fiziologic, lugol sau alt procedeu (vezi mai jos), este utilizat pentru cercetări coprocitologice și cercetări *coproparazitare* (fig. 53).

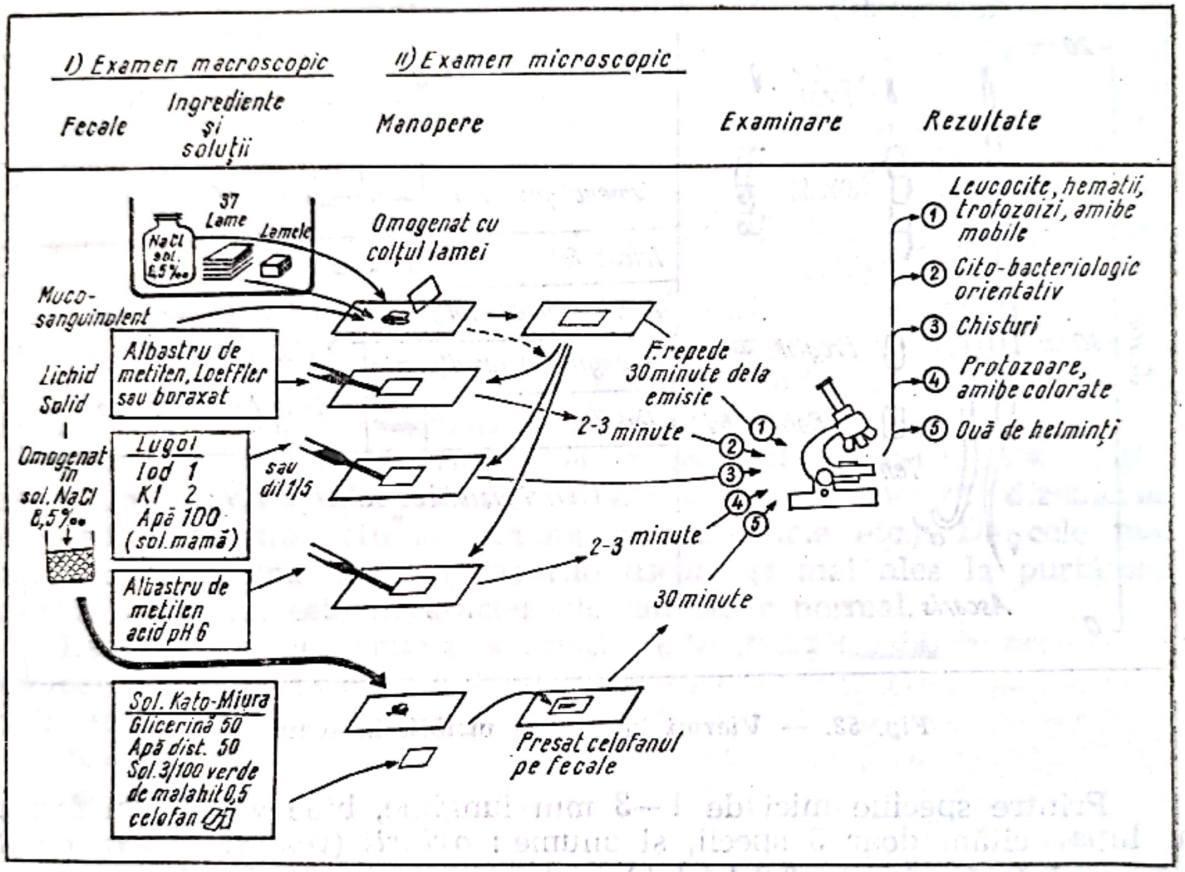


Fig. 53. — Examenul coproparazitologic extemporaneu orientativ.

Investigații coprocitologice. Un mic flocon de mucus din scaun sau o mică picătură de fecale lichide proaspete sau conservate pînă la 24 de ore la 4°C sînt amestecate cu o cantitate aproximativ dublă de albastru Löffler. Se aplică deasupra o lamelă și, după 2—3 minute, se examinează cu obiectiv × 40. Prezența de leucocite în cantitate mare indică în 90% din cazuri o infecție bacteriană. O preponderență de peste 75% de polinucleare se constată în diareele invazive produse de specii de Shigella, de unele tulpini invazive de Salmonella, de E. coli, precum și în rectocolitele ulceroase, unde se pot evidenția și eozinofile.

În febra tifoidă și în diareea acută „alergică", leucocitele sînt mai puține, în proporție de aprox. 95% fiind mononucleare. Absența de

leucocite indică, de obicei, o diaree produsă de virusuri sau de bacterii enterotoxigene neinvazive, ceea ce contraindică o antibioticoterapie.

Investigații parazitologice. Întotdeauna, se respectă o serie de reguli generale enumerate mai jos. Este bine ca întotdeauna, *obligatoriu* pentru *cercetări de amibe*, ca scaunul să fie prelucrat imediat (cald) și ca soluțiile, lamele și lamela să fie menținute la 37°.

— Se prelevează mai multe porțiuni mici din bolul fecal, care se amestecă și se omogenizează cu ser fiziologic, pentru a se obține un material uniform de aprox. 1—3 ml. Din acest produs, *se fac întotdeauna 3 preparate* (ser fiziologic eventual cu eozină, soluție lugol și soluția Kato-Miura). Pentru examinare la microscop, produsul se *acoperă cu o lamelă* de sticlă (sau cu celofan). *Lamelele* (sau dreptunghiurile de celofan) *obligatoriu trebuie să fie mai mici decît lamele de sticlă portobiect.* Atenție ca produsul examinat să nu se reverse de sub lamelă pe lamă ! Este bine să se folosească, pentru aceste examene, lame mai mari și anume de 40 × 80 mm sau de 50 × 100 mm.

Examenul microscopic se face cu obiectiv uscat × 10 și apoi cu × 40 și cu ocular × 10 (dacă se poate în contrast de fază).

Este necesar să se poată aprecia dimensiunea elementelor observate, deoarece constituie un factor important de diagnostic (semnalăm că latura unui pătrat mic din camera Bürker-Türck este de 50 μm). Acesta poate servi de referință, examinînd la microscop preparatul parazitologic și comparînd alternativ dimensiunea elementelor cu cadrilajul camerei, examinate bineînțeles cu aceeași mărime de ocular și de obiectiv. Aprecierea dimensiunilor se mai poate face prin comparare cu diametrul eritrocitelor (7 μm), aflate spontan sau introduse în preparatul umed.

Examenul coprologic trebuie repetat de mai multe ori, la cîteva zile interval, pentru a surprinde eliminările intermitente de paraziți și ouă (fig. 54).

— Examenul în *ser fiziologic* se face punînd pe mijlocul lamei de sticlă portobiect o picătură de *ser fiziologic* (sau de soluție de eozină 1 g/100 ml, în ser fiziologic, care colorează în roșu fondul, picăturile de grăsime și de amidon, iar chisturile încă vii și trofozoiții de protozoare rămîn necolorați, detașîndu-se pe fondul colorat). Se adaugă o mică porțiune de scaun și se amestecă bine, se acoperă cu o lamelă și se examinează repede, înainte de a se usca. Suspensia trebuie să fie uniformă, ușor opalescentă, dar destul de străvezie „ca să se poată citi prin preparat literele unui jurnal plasat sub lamă". Se pot decela toți trifozoiții de protozoare vii și diferite ouă de paraziți, dacă numărul lor este suficient de mare.

— Examenul cu soluție *lugol* completează examenul în ser fiziologic. Tehnica este aceeași, cu singura deosebire că, în loc de ser fiziologic, se utilizează lugol în soluție proaspătă de 1—2 săptămîni, mai concentrat decît soluția pentru coloratia Gram (Iod metaloid 1 g. Iodură de potasiu 2 g, apă distilată 100 ml). Metoda este indicată pentru evidențierea chisturilor de protozoare, care se colorează în brun.

Scanned with OKEN Scanner

— *Preparatul Kato-Miura.* Se pregăteşte din timp, într-un borcan, un amestec de părţi egale (de ex., cîte 50 ml din fiecare), glicerină şi apă distilată, la care se adaugă 0,5 ml dintr-o soluţie apoasă 3 g/100 ml verde malachit, în care se cufundă dreptunghiuri de celofan de aprox. 30/40 mm. După 24 de ore de maturare, acestea se pot utiliza indefinit.

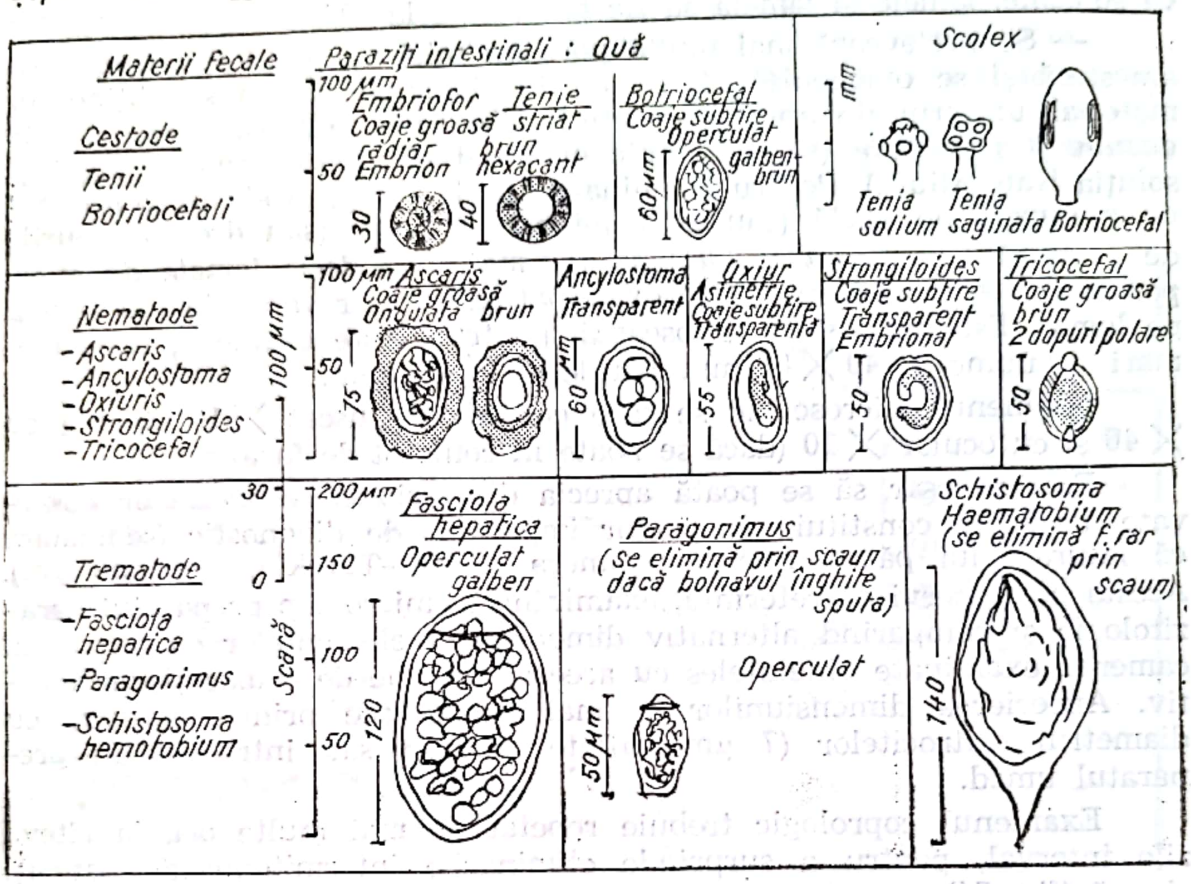


Fig. 54. — Ouă de paraziţi intestinali în fecale.

Pe mijlocul unei lame portobiect de sticlă mare, de cel puţin 50/100 mm, se pune o mică porţiune de fecale (cît un bob de grîu). Se acoperă cu un dreptunghi de celofan, „pescuit" din soluţia glicerinată de mai sus şi se presează celofanul cu un dop de cauciuc sau cu un alt obiect, în aşa fel încît preparatul să se întindă ca un disc de 1,5—25 mm diametru (vezi fig. 53). Se lasă pe masă (pentru clarificare) 30 de minute, apoi se examinează la microscop. Se pot decela toate ouăle de helminţi, cu observaţia că, la ouăle de ascarizi, membrana mamelonată este estompată, iar ouăle de fasciola şi de botriocefal apar cu o cută longitudinală, din cauza contracţiei membranei.

— La aceste examene coproparazitare elementare şi obligatorii, se adaugă, în caz de suspiciune de *oxiuri*, amprenta pe banda transparentă adezivă („scotch") recoltat ădin regiunea anală (vezi *2.8.0.0.2.* şi fig. 51).

În afara acestor procedee simple, se mai poate recurge şi la tehnici de îmbogăţire prin flotaţie, în soluţii saline cu densitate mare (cu aplicabilitate limitată), sau la concentrări prin centrifugare-sedimentare a

scaunului tratat cu formalină-eter (procedeu mai pretenţios, dar de aplicabilitate mare mare). Aceste procedee şi diverse altele, precum şi culturi (amibe, strongyloides) sînt de obicei de domeniul specialiştilor în laboratoarele de parazitologie. În scaun, se pot evidenţia un număr foarte mare de variate specii ale tubului digestiv, mai rar ale organelor anexe, excepţional din alte organe sau de tranzit, proveniţi de la animale, din mediul exterior şi ingeraţi cu alimentele de origine animală, vegetală sau „de băcănie".

Se pot evidenţia trofozoiţi şi chisturi de protozoare : adulţi, fragmente, larve şi ouă de helminţi ; foarte variate resturi alimentare, digerate parţial sau nedigerate, de origine animală sau vegetală.

Această faună şi resturile alimentare sînt mult mai variate şi abundente la persoanele venite din ţările calde, în special din regiuni tropicale.

Citǎm, în treacăt, numai cîţiva paraziţi, mai des întîlniţi în scaun la noi în ţară, al căror diagnostic prezumtiv de altfel este relativ uşor de făcut, urmînd ca identificarea exactă să fie făcută de către parazitologi. Recomandăm ca acei nespecialişti, care execută un examen coproparazitologic, să consulte tabele, planşe şi manuale de specialitate.

Protozoare (vezi şi *3.2.4.1.3.*). Trofozoiţi sau chisturi : *amibe* (peste 10 specii la om, plus altele exterioare, eventual condiţionat patogene) ; *flagelate* (Giardia lamblia, Trichomonas şi altele) ; *ciliate* (Balantidium coli şi altele) (fig. 55).

Helminţi (vezi şi *3.2.4.1.1.*). Adulţi sau fragmente, larve sau/şi ouă :

Cestode, platelminţi sau viermi plaţi în panglică, excepţional întregi, numai după tratament : strobile, adică înşiruiri de proglote, proglote izolate, ouă, embriofori ; tenii — mai multe specii (Taenia solium, Taenia saginata, Hymenolepis, Diphyllobotrium latum) (vezi fig. 52).

Nematode, viermi cilindrici, adulţi, larve, ouă (Ascaris lumbricoides, Trichocephalus, Ancylostoma, Strongyloides, Trichinella spiralis) (vezi fig. 52).

Nematode, viermi plaţi ovalari, proveniţi din organele vecine (căi biliare etc.) sau de la distanţă, rar întîlnite, ca Fascicola hepatica. Excepţional, se pot vedea în scaun şi ouă de Schistosoma mansoni (vezi fig. 54).

Pentru identificarea orientativă a *ouălor,* se va avea în vedere dimensiunea, forma şi simetria lor, membrana operculului (cînd există) şi culoarea, precum şi embrioforii (vezi fig. 54).

În scaun, se pot evidenţia un număr foarte mare de variate specii de paraziţi ai tubului digestiv, mai rar ai organelor anexe, excepţional din alte organe sau de tranzit, proveniţi de la animale, din mediul exterior şi ingeraţi odată cu alimentele de origine animală, vegetală sau „de băcănie" (fig. 56).

Insistăm, încă o dată, asupra necesității colaborării cu un parazitolog, mai ales pentru identificarea unei formațiuni microscopice neobișnuite pentru examinatorul nespecialist.

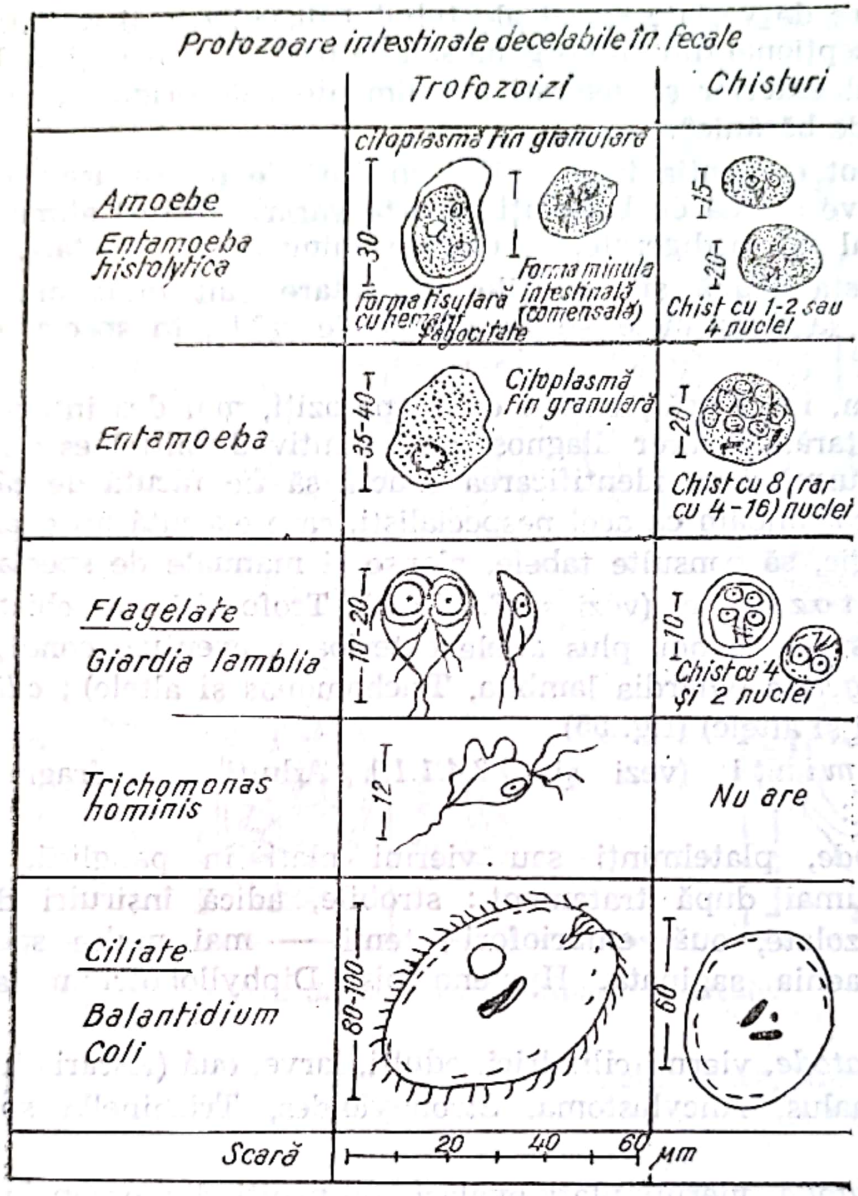


Fig. 55. — Protozoare intestinale decelabile în fecale.

2.8.0.0.3.3. Examenul microscopic al frotiului fixat și colorat cu albastru de metilen și cu Gram. Preparatul se examinează succesiv cu obiectiv uscat ×10, ×40 și apoi cu obiectiv de imersie. Se pot pune în evidență resturi alimentare, celule, în special polinucleare și hematii în infecții ale intestinului terminal și bacterii ca bacili și coci gram-pozitivi și gramnegativi. Examenul frotiului colorat cu Gram nu prezintă interes pentru examenul parazitologic și puțin interes pentru acel bacteriologic, cu excepția unor enterocolite acute, în special a celor postantibiotice și a celor produse de Bacillus cereus și Bacillus anthracis (vezi *2.8.0.0.1.*).

Scanned with OKEN Scanner

Prezența în număr covîrșitor de coci grampozitivi, des în grămezi (stafilococi), în diareele postantibiotice cu spectru larg, indică o *enterită stafilococică*, care trebuie tratată de urgență, în mod corect, fără a aștepta rezultatul examenului cultural și deci și al antibiogramei (vezi *2.8.0.0.1.8*). Se pot evidenția stafilococi în scaun și în alimentul infectant,

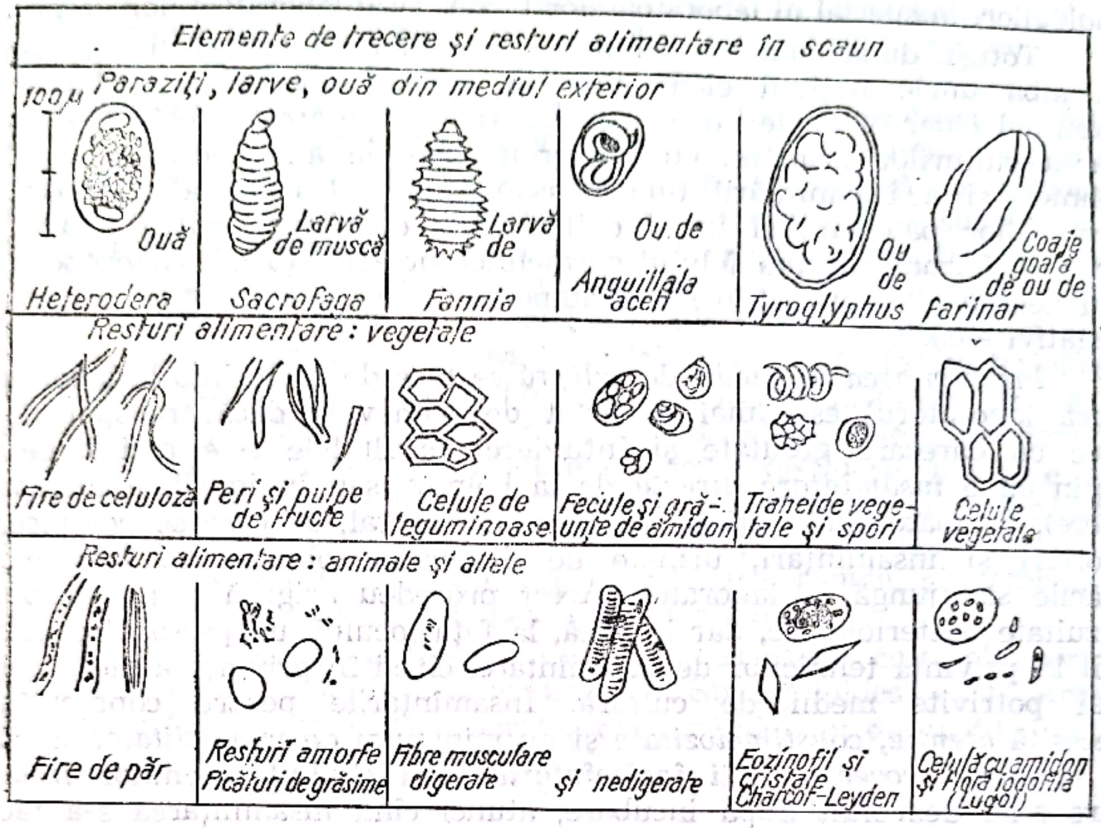


Fig. 56. — Elemente de trecere și resturi alimentare în fecale.

în cazul toxiinfecțiilor alimentare stafilococice, afecțiune mult mai puțin gravă, care de cele mai multe ori se vindecă spontan sau cu un tratament simplu simptomatic și de reechilibrare hidroelectrolitică. Se pot întîlni toxiinfecții (de fapt intoxicații) alimentare stafilococice cu coci vizibili în scaun și în alimente, dar cu culturi negative, dacă alimentul respectiv a suferit un oarecare tratament termic, deoarece stafilococii sînt mai puțin rezistenți la căldură decît enterotoxina lor.

În cărbunele gastrointestinal și în toxiinfecția produsă de Bacillus cereus (prin ingestia unor alimente intens contaminate), în frotiurile din materiile fecale se pot evidenția numeroși bacili grampozitivi mari și încapsulați, de cele mai multe ori.

Prezența în număr foarte mare, uneori covîrșitor, de *Candida albicans*, sub formă de *levuri izolate* (cum se evidențiază adesea în număr mic în scaunul normal) și sub *formă filamentoasă de micelii* (care nu apar în scaunul normal), mai ales dacă coexistă cu fenomene clinice bucale, anale și perianale, survenite după tratamente cu antibiotice (în special cu spectru larg), asigură diagnosticul de candidoză (vezi și *2.8.0.0.1.8.*).

În *dizenteria acută*, examenul microscopic în preparat umed pune în evidență mucus, fibrină, celule (în special polinucleare și eritrocite) și germeni neidentificați morfotinctorial, dar de obicei fără fecale și resturi alimentare.

2.8.0.0.4. Coprocultura. Acest examen este de resortul microbiologilor, în special al laboratoarelor C.S.A. și al laboratoarelor de profil.

Totuși, după cum am semnalat, este bine ca uneori și clinicianul să aibă unele noțiuni elementare în această direcție și să execute exentual chiar el unele etape, cum ar fi însămînțarea corectă și examinarea culturilor primare, cu un prim scop de a-și controla calitatea tehnicii și a însămînțării (indispensabilă pentru izolarea ulterioară a germenilor patogeni) și în al doilea rînd, eventual, pentru a avea o primă informare asupra felului germenilor prezenți (bacili lactozopozitivi sau negativi, gramnegativi sau grampozitivi, coci grampozitivi sau gramnegativi etc.).

Însămînțarea pe medii de cultură se face de preferință la laborator. Dacă laboratorul este mai depărtat de bolnav și dacă transportul se face cu oarecare greutate și întîrziere, rezultatele cele mai bune se obțin cu o *însămînțare directă* de la bolnav (sau în imediata lui apropiere), cu materialul obținut cu tamponul rectal, cu care se pot face și frotiuri și însămînțări, urmate de dispersare obligatorie, înainte ca plăcile să ajungă la laborator. Acest procedeu asigură cele mai bune rezultate bacteriologice, dar implică, la fața locului, un personal calificat atît în privința tehnicilor de însămînțare, cît și în privința alegerii celor mai potrivite medii de cultură. Însămînțările pentru coprocultură necesită *atenție, conștiinciozitate* și un minimum de *manualitate*, precum și *controlul corectitudinii însămînțării*, prin studiul coloniilor izolate, care s-au dezvoltat după incubare, atunci cînd însămînțarea s-a făcut corect pe medii solide.

Materiile fecale, emise spontan sau recoltate cu tamponul rectal, sînt aduse la laborator într-un conținător etanș, eventual cu un mediu de îmbogățire, și vor fi însămînțate cît de curînd. Pentru aceasta, se prelevează mici porțiuni de fecale din diferite porțiuni ale bolului fecal, care vor fi amestecate și omogenizate în 2—5 ml ser fiziologic steril sau mai bine în apă peptonată (dacă scaunul este lichid, această operație este mult ușurată). Cu acest produs, se însămînțează, după caz, diferite medii (solide sau lichide).

Însămînțarea pe medii solide se face fie cu o ansă de *platină*, fie (de preferință) cu o pipetă Pasteur închisă și îndoită la vîrf, pentru a nu zgîria geloza. Se face o dispersare progresivă a însămînțării pe rînd în mai multe sectoare, pentru a obține colonii separate (vezi fig. *13* și *1.3.7.0.5.6.*).

În privința mediilor de cultură, în funcție de indicațiile epidemiologice și clinice avute și dacă există o suspiciune bine fondată de o anumită etiologie, se poate uneori folosi un singur mediu. Astfel : în suspiciunea de dizenterie, se însămînțează pe mediu solid agar dezoxicolat-citrat-lactozat (mediul A.D.C.L. al Institutului Cantacuzino) ; în

suspiciunea de holeră *, însămînţarea se face pe apă peptonată alcalină ; în suspiciunea de febră tifoidă, se însămînţează direct pe mediul puternic selectiv Wilson-Blaire şi pe mediul de îmbogăţire selectiv lichid (bulion-selenit). În majoritatea cazurilor, se însămînţează pe 2 sau chiar 3 medii, şi anume : un mediu bogat (geloză-sînge) ; un mediu diferenţial, pentru germeni lactozopozitivi sau lactozonegativi (geloză lactozată) ; eventual, un mediu uşor selectiv (Mac Conkey) sau cu selectivitate medie (agar dezoxicholat-citrat-lactozat).

Clinicianul mai poate face, el însuşi, frotiuri din coloniile suspecte, pentru a vedea dacă germenii sînt grampozitivi sau gramnegativi şi care este forma şi dispoziţia lor. Pentru aceasta, se prelevează cu marginea ansei o foarte mică parte dintr-o colonie, cu care, după suspensie şi omogenizare cu o mică picătură de ser fiziologic, se fac frotiuri. Din restul coloniei, se fac transplante cu dispersie, pentru a se obţine tulpini pure, în vederea cercetărilor bacteriologice ulterioare. Identificarea ulterioară a germenilor cade în sarcina laboratoarelor de bacteriologie (laboratorul central de spital, laborator C.S.A. sau laborator de profil sau de referinţă). Semnalăm doar că, pentru identificarea germenilor, este necesar să se consulte excelentele scheme de lucru, manuale sau tratate de specialitate apărute în ultimii ani în ţară şi străinătate. Semnalăm, în treacăt, că au apărut în unele ţări o serie de seturi şi dispozitive practice, care permit o identificare rapidă şi comodă a germenilor. Introducerea lor în ţară este în studiu.

Semnalăm că există posibilitatea unor examene culturale pentru paraziţii intestinali (amibe, Trichomonas, Strongyloides etc.). Aceste cercetări se fac de regulă în laboratoarele centrale sau de profil.

★

Urgenţa examenelor coprocitologice, coproparazitologice şi coprobacteriologice, precum şi a antibiogramei germenului patogen în cauză, trebuie privită din mai multe puncte de vedere.

Aceste examene sînt întotdeauna necesare, în scop ştiinţific şi statistic, ele pot fi necesare în scop antiepidemic şi pentru sentinţe legale (declarare şi izolare obligatorie), precum şi pentru criterii de prognostic. În fine, aceste examene pot fi necesare pentru sentinţe terapeutice, mai mult sau mai puţin urgente.

De notat că orice *diaree severă,* mai ales la sugar, la copilul mic, în colectivităţi dense, unde condiţiile de sanitaţie sînt deficitare, trebuie considerată *contagioasă* şi trebuie luate măsurile antiepidemice, chiar înaintea examenelor de laborator.

În gastroenteritele acute, vărsăturile incoercibile şi diareele profuze (fie toxiinfecţii, fie chiar holeră sau altă boală), reechilibrarea hidroelectrolitică este pe primul plan şi trebuie asigurată urgent. În aceste cazuri, antibiotico- sau chimioterapia singură, chiar dacă germenul în

* Nu orice tulburare intestinală foarte gravă şi chiar mortală este holeră ! Cu zeci de ani în urmă s-a produs o mică, dar gravă, epidemie de cărbune intestinal, care a fost luată la început drept holeră !

Scanned with OKEN Scanner

cauză este sensibil, nu poate ea singură să rezolve cazul. Mai mult, în special în toxiinfecţiile cu salmonele, ea poate fi dăunătoare, producînd dezechilibre ecologice în flora intestinală.

În dizenterie şi chiar în febra tifoidă, aceste examene nu sînt totdeauna urgente, deoarece aceste boli se vindecă deocamdată adeseori cu tratamente raţionale, bazate pe experienţa anterioară. Doar în cazuri speciale, rebele la tratament sau în anumite condiţii epidemiologice, antibiogramele germenilor în cauză vor influenţa tratamentul.

În febra tifoidă şi în dizenterie, coproculturile sînt cerute prin lege, nu atît pentru stabilirea diagnosticului, cît mai degrabă pentru preavizarea stării de purtător fecal, urinar sau pe altă cale şi pentru stabilirea duratei stării de eliminator periculos de bacili.

În formele septicemice, bineînţeles, izolarea şi determinarea sensibilităţii germenului în cauză constituie o urgenţă pentru aplicarea unui tratament ştiinţific, corect.

Examenele coproparazitare, deşi indispensabile pentru instituirea corectă a tratamentului, nu constituie o urgenţă medicală, avînd în vedere evoluţia de obicei lentă a acestor boli.

2.9. EXSUDATE, TRANSSUDATE, PUROI ŞI COLECŢII ÎNCHISE

Examinarea lichidelor limpezi, seroase, opalescente, hemoragice sau tulburi purulente, obţinute prin puncţii pleurale, peritoneale, articulare, în abcese şi colecţii ale părţilor moi, în chisturi, sinusuri, focare de osteomielită etc., se face în general observînd aceleaşi indicaţii şi tehnici, ca şi pentru L.C.R. Se aplică aceleaşi reguli de strictă curăţare şi dezinfecţie a pielii, de evitare a unor infecţii şi suprainfecţii atit pentru bolnav, cit şi pentru produsul obţinut. Se fac aceleaşi examene macroscopice şi microscopice citomicrobiologice şi culturale ale produsului. Sînt însă unele particularităţi, legate de localizarea colecţiei puncţionate, de particularităţile produsului extras (care poate fi lichid filant, grunjos, purulent, vîscos sau cremos), de agenţii patogeni posibili (coci şi bacili grampozitivi şi gramnegativi, micobacterii, aerobi şi anaerobi, floră mixtă plurimicrobiană, micoplasme, paraziţi şi virusuri) şi de condiţiile lor de cultivare. Uneori, puncţia exploratoare trebuie urmată de o puncţie-biopsie (sau de un act operator).

2.9.0.0.1. Recoltarea produselor patologice se face cu toate precauţiile necesare pentru evitarea contaminării acestora cu microorganisme sau cu germeni, proveniţi din alte regiuni decît din focarul explorat.

Lichidele extrase din seroase inflamate (în special din pleură) pot fi serofibrinoase, citrine şi pot să conţină multă fibrină, producînd repede o coagulare spontană a lichidului extras. În cheagul format, sînt înglobate majoritatea celulelor şi o bună parte din germeni aflaţi acolo. Din această cauză, este bine ca lichidul extras să fie repartizat şi într-un

Scanned with OKEN Scanner

tub cu un *anticoagulant* (de ex., citrat de sodiu, soluţie 3,8/100) (fig. 57).

Lichidele, mai ales din articulaţii şi din unele chisturi, sînt foarte vîscoase, ceea ce necesită *fluidificarea* lor eventuală cu tripsină, N-acetil-cisteină sau cu alte substanţe (Bisolvon, Bromhexin).

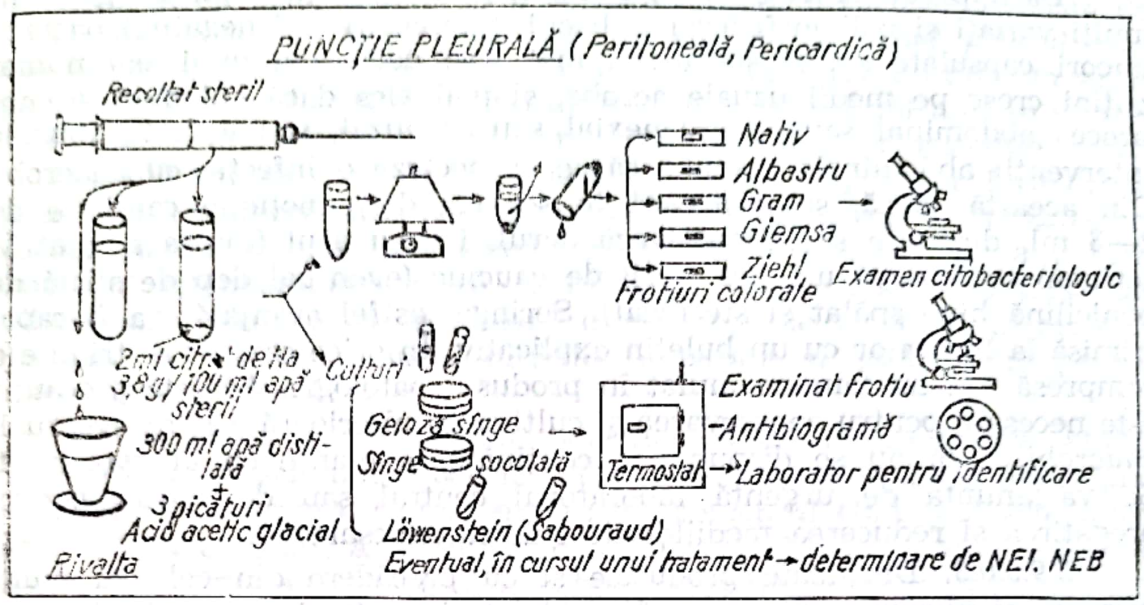


Fig. 57. — Puncţia pleurală, peritoneală, pericardică.

Etiologia tuberculoasă fiind posibilă, nu se va neglija niciodată o colorare cu Ziehl şi însămînţarea pe mediul Löwenstein-Jensen.

Examenul macroscopic şi microscopic, morfotinctorial, citobacteriologic al produsului este foarte important şi deci este obligatoriu şi trebuie să preceadă alte examene bacteriologice, deoarece va orienta mersul şi ierarhizarea analizelor ulterioare.

2.9.0.0.2. Examenul microscopic al produsului nativ, între lamă şi lamelă, şi apoi colorat cu albastru de metilen, cu Gram, cu Ziehl şi cu Giemsa, poate pune în evidenţă diferite feluri de celule, ca : leucocite polinucleare neutrofile (des alterate), eozinofile, limfocite, eritrocite, endotelii, mezotelii (pleură, peritoneu), detritusuri celulare, fibrină, precum şi diferite bacterii, fungi, paraziţi. Predominarea polinuclearelor sugerează un proces bacterian acut, numărul mare de limfocite sugerează unul cronic, iar dacă se observă celule mononucleate atipice (cu citoplasmă bazofilă, nuclei multipli sau înmuguriţi, mitoze), mai ales în „cuiburi" sau în placarde, trebuie luată în considerare şi etiologia neoplazică posibilă.

Indiferent dacă se evidenţiază sau nu germeni la microscop, se fac obligatoriu *culturi* pe *diferite medii, inclusiv pe geloză-sînge, pe geloză-sînge şocolată şi pe Löwenstein.* Dacă se evidenţiază germeni numai de acelaşi aspect morfotinctorial, însămînţările se fac în funcţie de felul germenilor presupuşi (pneumococi, stafilococi, neisserii, coli-

formi etc.). Dacă numărul germenilor de acelaşi fel este mare* (de ex., 1—10 în medie pe cîmp microscopic), se poate face, dar *numai dacă clinicianul judecă că este necesar şi urgent,* o antibiogramă rapidă, orientativă, primară, direct din produse (care va fi *repetată a doua zi din cultură pură).*

Dacă produsul este fetid, purulent, cu sînge alterat, cu germeni mulţi variaţi şi polimorfi (coci şi bacili grampozitivi şi negativi) bacterii uneori capsulate sau/şi sporulate, mai ales dacă nici unul sau numai puţini cresc pe medii uzuale aerobe, şi mai ales dacă bolnavul are un proces abdominal sau uteroanexial sau sinuzal, sau a fost supus la intervenţii abdominale, trebuie să se suspecteze o infecţie cu anaerobi. Din această cauză, se păstrează în seringa de puncţie o cantitate de 2—3 ml, din care se îndepărtează aerul, iar cu acul (rămas montat la seringă) se înţeapă un dop steril de cauciuc (eventual dop de sticlă de penicilină bine spălat şi sterilizat). Seringa, astfel aranjată, va fi rapid trimisă la laborator cu un buletin explicativ. În orice caz, nu se trimite o compresă sau un tampon muiat în produsul patologic. Această precauţie este necesară pentru conservarea şi cultivarea ulterioară a unor eventuali *anaerobi,* dacă nu se dispune de conţinătoare etanşe cu un gaz inert. Se va anunţa de urgenţă laboratorul central sau de profil, pentru pregătirea şi reducerea mediilor de cultură necesare.

2.9.0.0.3. Din toate produsele şi cu precădere din cele cu mulţi germeni şi plurimicrobiene, se fac obligatoriu *culturi semicantitative,* cu dispersări succesive pe 4 cadrane ale unei cutii Petri (vezi fig. 13 şi *1.3.7.0.5.6.*), pentru aprecieri nu numai calitative şi cantitative, dar şi proporţionale între diverşi germeni.

Dacă a doua zi, pe mediile de cultură nu se observă colonii sau apar puţine colonii, constrastînd cu numărul mare de germeni văzuţi la microscop, aceasta poate fi datorită faptului că bolnavul a fost tratat cu antibiotice, care inhibă creşterea bacteriilor, sau mai frecvent că este vorba de infecţii cu germeni pretenţioşi sau foarte pretenţioşi (neisserii, hemofili, Legionella pneumophila din „boala legionarilor", chlamidii, micoplasme) sau, cel mai precvent, este vorba de germeni anaerobi.

Uneori, se pot găsi, în diferite regiuni ale organismului, dar în special în creier şi în ficat abcese zise „amicrobiene" sau cu „culturi sterile". Acestea sînt de obicei datorate fie unor defecte de tehnică, de colorare, fie unor medii de culturi prea sărace, mai rar unor procese autosterilizate spontan sau prin antibiotice, dar de cele mai multe ori unor abcese cu anaerobi, abcese amibiene, abcese cu bacili Koch sau fungice.

În toate colecţiile purulente, asanarea focarului (puncţii, drenare sau, deseori, tratament chirurgical) este pe primul plan! Indiferent de

* Se poate folosi următoarea scară convenţională :
1—2 germeni la 25 cîmpuri microscopice = foarte rari $\approx 10^2$.
1—2 germeni la 10 cîmpuri microscopice = rari $\approx 10^3$—10^4.
1—5 germeni, în medie, pe cîmp microscopic = relativ numeroşi $\approx 10^5$—10^6.
10—50 germeni, în medie, pe cîmp microscopic = numeroşi $\approx 10^6$—10^7.
Peste 50 de germeni, în medie, pe cîmp microscopic = foarte numeroşi $> 10^7$.

Scanned with OKEN Scanner

germenii în cauză, antibioticele şi chimioterapicele pot fi inutile sau cel mult ajutătoare.

2.9.0.0.4. Observaţii particulare (privind unele situaţii mai des întîlnite) :

2.9.0.0.4.1. Puncţia pleurală. După dezinfecţia riguroasă a pielii şi pătrunderea cu acul montat la o seringă sterilă în pleură, se poate de obicei scoate cu uşurinţă o cantitate de 20—40 ml *lichid pleural* care este repartizat imediat în 2 tuburi, dintre care unul conţine un anticoagulant. Pentru 10 ml de lichid extras, se adaugă 3 ml dintr-o soluţie sterilă de citrat trisodic 3,8 g/100 ml (sau 1,5 ml dintr-o soluţie sterilă de 1 g/100 ml de EDTA). Îndepărtarea cheagului, odată format, cu perle sau triturarea lui, este contraindicată, deoarece în reţeaua de fibrină rămîn o serie de elemente, eventual şi germeni, aşa încît examenul citomicrobiologic va fi falsificat. Dacă lichidul extras este tulbure sau purulent, se păstrează o cantitate de 2—3 ml în seringă, din care se fac, la nevoie, diferite preparate şi însămînţări pentru anaerobi (vezi *2.9.0.0.2.*).

Se va evita, pe cît posibil, pătrunderea de aer în pleură, atunci cînd eventual se schimbă o seringă cu alta. Se procedează repede, rugînd bolnavul să nu respire sau să expire în momentul cînd acul este liber. Uneori, însă este util a se introduce o mică cantitate de aer în pleură, pentru vizualizarea radiologică mai bună a unor pleurezii închistate sau a unor empieme.

Lichidul pleural poate fi limpede, serocitrin, chilos, hemoragic, tulbure sau purulent.

Reacţia Rivalta se face, dacă lichidul extras este limpede, serocitrin. Reactivul se compune din 300 ml apă distilată, la care s-au adăugat 3 picături de acid acetic glacial (orice altă proporţie poate da rezultate false ; excesul de acid duce la solubilizarea acid albuminelor serice). În acest reactiv, pus într-un pahar conic, se pică 1—2 picături de lichid pleural. Dacă nu se produce nimic, reacţia este negativă, ceea ce înseamnă că lichidul conţine proteine sub 2,5 g/100 ml, deci este un *transsudat* de natură mecanică, prin stază circulatorie sau prin afecţiuni renale. Dacă se produce o opalescenţă, ca un fum de ţigară, reacţia este pozitivă, ceea ce înseamnă că lichidul conţine proteine peste 3 g/100 ml, adică este un exsudat de natură inflamatorie (de ex., în pleurezia tuberculoasă) (vezi fig. 57).

Examenul morfotinctorial citomicrobiologic se face din sedimentul de centrifugare bine scurs, dacă lichidul este limpede sau opalescent, ca pentru L.C.R., şi direct din lichid, dacă este tulbure şi purulent. Se face, mai întîi, un examen extemporaneu proaspăt, între lamă şi lamelă, şi apoi se fac cel puţin 5 *frotiuri*, care se colorează cu albastru de metilen şi, respectiv, cu Gram, cu Ziehl şi cu Giemsa. Al cincelea este păstrat de rezervă. Frotiurile, ca şi pentru sînge sau pentru L.C.R., trebuie să se usuce imediat, în cîteva secunde ; dacă se usucă mai încet, peste 1—2 minute, sînt inutilizabile, deoarece celulele sînt ratatinate şi îşi pierd morfologia lor caracteristică, iar germenii — eventual fagocitaţi sau alipiţi de celule — devin deseori de nerecunoscut. S-a mai

Scanned with OKEN Scanner

recomandat ca sedimentul să fie suspendat într-o mică cantitate de ser sanguin steril, după care se fac frotiurile. În felul acesta, morfologia celulară este mai bine păstrată, dar manopera nu este totdeuna comodă, din lipsă de ser sanguin steril și din cauza posibilității de a suprainfecta produsul.

Prezența leucocitelor polinucleare în număr mare și net preponderent, față de altfel de celule, pledează pentru o infecție bacteriană acută. Prezența de limfocite mici, mature, alături de celule mezoteliale, pledează pentru o infecție cronică de diferite naturi (de ex., tuberculoză). Eozinofilele apar în afecțiuni parazitare, alergice și în cursul și la sfîrșitul unor hemotoraxuri. Un tablou citologic pestriț, cu celule de mai multe feluri (leucocite, polinucleare, limfocite, cîteva hematii) și celule mezoteliale mari cu nuclei, care pot avea mai mulți nucleoli, uneori în mitoză, și cu citoplasma intens bazofilă, se pot observa la începutul unor iritații seroase de diferite naturi, transsudate la cardiaci și la renali, exsudate la începutul unei pleurezii tuberculoase, dar bineînțeles și în afecțiuni neoplazice, unde se evidențiază deseori placarde de celule mezoteliale intens bazofile și atipice. Diagnosticul citologic este deseori dificil. În pleureziile virale, predomină de obicei celulele mononucleate atipice.

Examenul microscopic direct, între lamă și lamelă, apoi colorat, permite uneori decelarea de diferiți agenți bacterieni ; rareori, se evidențiază fungi sau paraziți (amibe ; vezicule-fiice și cîrlige de scolex, în caz de chist hidatic rupt).

Pleureziile în marea majoritate a lor, sînt unimicrobiene : tuberculoase, pneumococice, stafilococice, streptococice, cu hemofili, cu klebsiele etc. Identificarea agentului și determinarea sensibilității lui la antibiotice poate fi de mare interes terapeutic.

Mai rar, pleureziile sînt plurimicrobiene (floră abundentă polimorfă aerobă și anaerobă) și aceasta indică fie o infecție propagată direct, transtoracică, fie printr-o fistulă bronhopulmonară, fie prin embolie septică a unui focar septic abdominal sau, mai rar, a unui focar amigdalian sau dentar.

Abcesele pulmonare sînt și ele, deseori, unietiologice, cu klebsiele stafilococice etc. ; mai rar, sînt plurimicrobiene, de obicei în urma unei infecții de aspirație, de intubație, a unei embolii septice de la un focar abdominal, deseori de la pelviperitonite sau tromboflebite periuterine.

Chisturile hidatice pulmonare se pot deschide în bronhii și se pot suprainfecta cu floră din căile aeriene.

2.9.0.0.4.2. Puncția pericardică trebuie făcută cu precauții, iar lichidul extras este examinat citologic și bacteriologic și virusologic, ca și lichidul pleural.

2.9.0.0.4.3. Puncția peritoneală poate pune în evidență o *ascită*, cu lichid limpede, serocitrin, mai rar serohemoragic, serobilios, foarte rar chilos, care poate fi întîlnit în afecțiuni hepatice (ciroză), la cardiaci, la renali sau în procese neoplazice. Tabloul citologic, ca și în pleurezii, poate fi de folos pentru lămurirea etiologică. Uneori, se poate confunda o ascită cu un chist ovarian mare, al cărui lichid este de obicei mai

Scanned with OKEN Scanner

vîscos. În peritonitele bacteriene, lichidul limpede sau ușor opalescent apare de obicei la peritonitele tuberculoase.

Reacția Rivalta va diferenția un exsudat de un transsudat.

Peritonitele bacteriene acute sînt rareori unietiologice : pneumococice, cu streptococi beta-hemolitici grup A (eventual și grup B), colibacilare, cu enterococi (mai ales la copii). Rareori, apar peritonite gonococice la femei, de obicei secundare unei anexite.

Peritonitele bacteriene acute sînt de obicei plurimicrobiene, drept urmare a unei perforații sau prin propagarea directă a unei infecții din căile biliare, a unei apendicite acute, a unei infecții uteroanexiale, a unei perforații de ulcer gastroduodenal sau a unei plăgi abdominale penetrante. În toate aceste cazuri, flora microbiană este aceea a căilor biliare, a segmentului intestinal afectat sau a florei din focarul uteroanexial, adică de obicei compusă din toți germenii care se află în intestin : parte aerobi coliformi, parte anaerobi bacili grampozitivi și sporulați (clostridii), mai ales bacili gramnegativi nesporulați (Bacteroides și Fusobacterium), care asigură fetiditatea produsului patologic. Însămînțările pe medii uzuale remit deseori creșterea preponderentă a colibacilului, dînd o falsă impresie a unei etiologii unimicrobiene.

Mirosul fetid de „colon" este datorat florei anaerobe și nu trebuie atribuit — în mod greșit — colibacilului, care nu miroase așa. Unii clinicieni neavizați sînt convinși că mirosul „de colon" este datorat colibacilului, primind în plus o aparentă confirmare de laborator, deoarece pe frotiu se constată din abundență bacili gramnegativi (care pot fi Bacteroides și nu colibacili), iar pe mediile uzuale aerobe vor putea crește colibacilii, dar nu anaerobii.

Tratamentul trebuie să fie în primul rînd chirurgical, de spălare și drenare a cavității abdominale ; iar antibioticoterapia nu poate să aibă decît un ușor efect ajutător, în cel mai bun caz. Deseori, însă, antibioticele nu fac decît să permită selectarea unor tulpini rezistente și special de nocive.

Pelviperitonitele, metritele și anexitele supurate prezintă unele particularități, privind căile de abordare și, mai ales, faptul că germenii patogeni pot necesita condiții speciale de cultivare (neiserii pretențioase, bacili Koch și, mai ales, anaerobi, poate și micoplasme, al căror rol patologic nu a fost încă bine lămurit).

Cavitatea uterină poate fi infectată ascendent, post abortum, post partum sau în urma unei intervenții cezariene ; uneori, este o infecție cu o singură (sau mult preponderent specie microbiană, alteori este o asociere de cîteva specii microbiene aerobe sau/și (foarte frecvent) anaerobe.

Recoltarea simplă din colul uterin, care este de regulă populat cu o floră abundentă și variată, induce deseori în eroare, în privința stabilirii etiologiei infecției uterine. Din această cauză, trebuie ca recoltarea să se facă cu „tamponul protejat", în urma unei toalete a regiunii, sub controlul vizual cu speculul vaginal. Tubul de protecție se inseră în colul vaginal și apoi se împinge prin el tamponul, pentru a recolta secreție din cavitatea uterului (fig. 58). Avînd în vedere natura germe-

Scanned with OKEN Scanner

nilor patogeni, se fac însămînţări pe medii uzuale, pe medii speciale pentru germenii pretenţioşi (de ex., neisserii) şi pe medii anaerobe. Avînd în vedere că infecţiile cu anaerobi sînt în general foarte masive, examenul microscopic al frotiului poate deseori să fie sugestiv (prezenţa unor bacili mari grampozitivi, uneori sporulaţi, uneori încapsulaţi sugerează Clostridium perfringens, iar prezenţa bacililor gramnegativi, pleomorfi, de dimensiuni variate, poate sugera o infecţie cu Bacteroides).

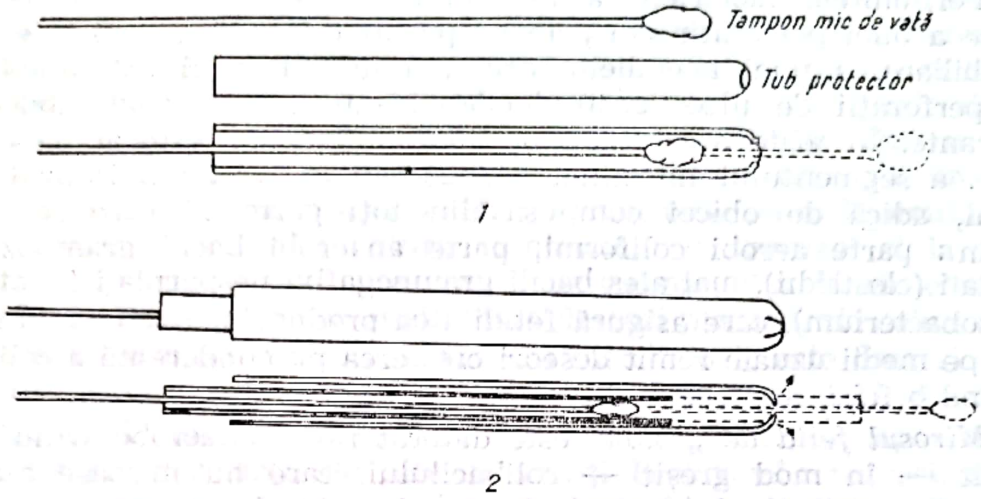


Fig. 58. — Recoltarea din uter (cu tamponul protejat).
1 — Tub protector simplu. Se introduce tubul protector cu tamponul în el. Se împinge tamponul pentru recoltare Se scoate tamponul. Se scoate tubul protector. *2 — Tub protector dublu.* Se introduce tubul protector extern (cu tubul protector intern şi tamponul în el). Se împinge tubul protector intern cu 20—30 mm, apoi tamponul. Se recoltează. Se scoate pe rînd tamponul, apoi tubul intern şi, în fine, tubul extern.

2.9.0.0.4.4. Puncţia hepatică. Cînd se suspectează un *abces amibian,* se evacuează mai întîi puroiul galben, care practic nu conţine amibe; la sfîrşit, cînd începe să se scurgă un lichid roşiatic, se recomandă să se introducă cîţiva mililitri (10 U/ml) de streptokinază (care favorizează desprinderea amibelor de pe peretele colecţiei) şi apoi să se extragă ultimii mililitri de lichid, mai bogat în paraziţi.

În ficat şi suprahepatic (subdiafragmatic) se pot produce supuraţii diverse cu bacterii, gramnegative şi grampozitive, aerobe şi anaerobe, de obicei cu germeni intestinali. Se mai pot produce chisturi hidatice, cu lichid clar, cu vezicule fine sau cu „nisip hidatic" (cîrlige) sau supuraţii secundare. Infecţiile hepatice au des un răsunet, sau o diseminare supradiafragmatică pleuropulmonară.

2.9.0.0.4.5. Puncţia articulară. Artritele prezintă ca particularităţi că lichidul extras este deseori vîscos, seropurulent sau purulent. În privinţa etiologiei bacteriene, trebuie să se ia în considerare tuberculoza, gonococia şi orice germen însămînţat acolo (stafilococi, streptococi, germeni enterali etc.; cu totul excepţional la noi în ţară brucele), în cadrul unei bacteriemii sau unei septicemii.

2.9.0.0.4.6. Colecţii şi supuraţii închise. Acestea sînt de obicei unimicrobiene, cu germeni piogeni banali, mai rar cu germeni enterali.

Scanned with OKEN Scanner

Abcesele cerebrale, abcesele dentare, abcesele de ficat şi chiar abcesele pulmonare, ca şi abcesele subcutanate la toxicomanii mari, la nevropaţi sau acolo unde s-au făcut multe injecţii (chiar cu antibiotice), pot fi cauzate de germeni banali, deseori de germeni rezistenţi la antibioticele uzuale, dar şi de anaerobi sau de paraziţi, eventual şi de fungi. În toate cazurile, se fac examene microscopice pe preparate colorate cu Gram, cu Ziehl, cu Giemsa, precum şi culturi pe medii variate, inclusiv pentru micobacterii şi fungi.

2.9.0.0.4.7. Puncţia ganglionară şi *puncţia medulară.* În aceste cazuri, se face, în special examen citologic, de preferinţă şi de un cadru cu experienţă. Se pot pune în evidenţă bacterii, dar şi paraziţi (de ex., toxoplasme etc.). Aceste cercetări trebuie făcute sau, cel puţin refăcute, de cadre de laborator bine specializate.

2.9.0.0.4.8. Celulite şi miozite nesupurate. Uneori, sînt crepitante, alteori necaracteristice, dar deseori sînt însoţite de tulburări de irigaţie sanguină şi de o culoare anormală a regiunii respective. De obicei, sînt datorate unor infecţii cu anaerobi sau unor infecţii mixte, de ex.: clostridii şi bacterii enterale. Puncţia exploratoare scoate uneori doar foarte puţin lichid seros sau serohemoragic. Pe frotiu, se văd de obicei un număr mare de bacterii. Evoluţia este deseori foarte rapidă, mortală, deseori chiar cu un tratament chirurgical larg practicat şi cu antibiotice active şi cu o seroterapie antitoxică.

2.10. PIELEA ŞI MUCOASELE EXTERIOARE (PRODUSE PATOLOGICE DIN FOCARE INFECŢIOASE DESCHISE ÎN EXTERIOR)

Tegumentele şi mucoasele, care vin direct sau indirect în legătură cu exteriorul (pielea din diferite regiuni, conjunctive, canalul auditiv extern, nazofaringe, gura, căile respiratorii superioare, intestinul terminal şi sfera urogenitală), sînt toate populate, în mod abundent, cu o floră saprofită proprie, foarte variată.

Aceste regiuni se pot însă şi infecta cu germeni exogeni, deseori patogeni, ca: stafilococi, streptococi, corinebacterii patogene, neisserii patogene, bacteridia carbonoasă, spirochete patogene etc. Se pot însă infecta şi cu oricare din saprofiţii regiunii respective (sau învecinate), care dintr-un motiv sau altul îşi capătă o patogenitate sporită şi, eventual, un caracter invaziv.

În procesele inflamatorii, apărute în aceste regiuni, trebuie — în primul rînd — să se deceleze (sau să se excludă) infectarea cu un germen de regulă patogen şi — în al doilea rînd — să se descopere (mult mai dificil) apariţia însuşirii de patogenitate a unui germen oportunist, ţinînd seama bineînţeles de flora normală a regiunii respective.

Produsele patologice, provenite din focare infecţioase interne, deschise direct în exterior sau în cavităţi naturale, pot fi suprainfectate, cu o floră foarte abundentă şi variată, provenită din aceste regiuni. Aceasta îngreuiază, de obicei, considerabil diagnosticul etiologic al infecţiei.

Scanned with OKEN Scanner

Astfel evidenţierea unui bacil acidoalcoolorezistent într-o secreţie otică, în lichidul gastric, în scaun sau în căile genitale, nu indică neapărat o infecţie tuberculoasă, putînd fi vorba de alte micobaterii saprofite. Evidenţierea de clostridii şi bacteroizi într-o secreţie vaginală sau chiar din colul uterin nu indică neapărat o infecţie cu aceşti germeni, ei putînd face parte din flora saprofită.

Pentru a atenua riscul acestor erori, se recomandă — dacă este posibil — o toaletă prealabilă cu spălarea regiunii eventual suprainfectată, cunoaşterea şi eventual examinarea florei saprofite a regiunii respective, recoltarea „protejată" a produsului patologic, ferindu-l pe cît posibil de contaminări secundare, folosind după caz catetere sau eventual tuburi concentrice (acel exterior protejînd pe acel interior în trecerea acestuia prin regiuni puternic populate cu floră saprofită). Aprecierea calitativă, cantitativă şi proporţională a germenilor este de mare importanţă. Astfel, anaerobii aflaţi normal în vagin şi, eventual, şi în partea distală a colului uterin, sînt în număr mic şi amestecaţi cu diferiţi alţi germeni, în timp ce în infecţii uterine cu anaerobi, aceştia se găsesc deseori în cantităţi imense, net preponderent faţă de restul florei coexistente, constituind un important argument pentru etiologia cu anaerobi a infecţiei (de ex., cu Cl. perfringens-grampozitiv, sau cu Bacteroides-gram negativ).

Aspectul morfologic şi tinctorial al germenilor, gruparea lor, prezenţa eventuală de capsulă sau de spori, poate sugera clinicianului anumite etiologii, care în contextul clinic şi epidemiologic pot constitui uneori o certitudine (abcese cu stafilococi, infecţie carbonoasă, uretrită gonococică etc.). Diagnosticul etiologic precis, cu identificarea taxonomică a germenului izolat, cade însă în sarcina microbiologului. Clinicianul va colabora, în mod eficace, cu microbiologul şi va recurge, deseori, cu folos la consultarea manualelor de microbiologie.

Atragem atenţia că aspectul morfologic şi tinctorial al unor germeni în produsele patologice poate fi uneori înşelător, fie din cauza unui defect de colorare (în special, colorare de fond prea intensă în roşu la coloraţia Gram şi în albastru la coloraţia Ziehl) sau din cauza unor germeni aflaţi pe sticlăria necurăţată bine (ca în tubul în care se face diluţia pentru colorarea Giemsa) sau din cauza unor procese de liză bacteriană sau a unor modificări secundare unui tratament anterior cu antibiotice.

Laboratorul poate ajuta, poate confirma, poate preciza sau poate infirma o serie de suspiciuni clinice, privitoare la boli eruptive, boli de piele, boli venerice, boli parazitare şi micotice ale mucoaselor, ale tegumentelor şi ale părului. În toate aceste cazuri, este foarte utilă — de obicei indispensabilă — colaborarea cu microbiologii de specialitate.

Nu trebuie uitată posibilitatea unor boli, care pot scăpa nediagnosticate, cum ar fi : luesul, pediculoza şi diferite boli de import (leishmanioze, tripanosomiaze, treponematoze şi multe altele). Este de cea mai mare importanţă să se facă o recoltare corectă la momentul şi din locul potrivit şi o însămînţare corectă pe medii de cultură adecvate, în toate cazurile în care este vorba de germeni pretenţioşi (de ex., neiserii

Scanned with OKEN Scanner

patogene şi alţii). Aceste manopere se fac cel mai bine imediat în cabinetul de consultaţii sau la patul bolnavului. Dacă însă aceste condiţii nu se pot realiza, ceea ce se întîmplă des, în locul unei însămînţări defectuoase, este de preferat transportul rapid al produsului patologic la laboratorul central sau de profil în condiţii şi pe medii bune de conservare.

2.11. RECOLTĂRI LA NECROPSIE. PUNCŢIA-BIOPSIE. BIOPSIA

Aceste manopere se fac cu scopul de a depista o modificare histopatologică sugestivă sau caracteristică pentru o afecţiune proliferativă, degenerativă, boală de sînge, afecţiune de sistem (boală de colagen, vasculită, granulomatoză, tezaurismoză etc., sau o infecţie bacteriană, virală, micotică sau parazitară.

Bineînţeles, prima condiţie este aceea ca prelucrarea să se facă dintr-o zonă potrivită (afectată de boala în cauză), ca fragmentul să fie reprezentativ, de preferinţă călare pe o zonă normală şi pe una patologică, şi — în fine — pentru cercetări microbiologice, să se evite contaminarea produsului sau alterarea lui între momentul recoltării şi acel al examinării.

2.11.0.0.1. Prelevări la necropsie. Acestea trebuie să se facă cît de curînd după moarte, deoarece deseori ţesuturile sînt invadate cu germeni intestinali, aerobi şi mai ales anaerobi, uneori chiar din perioada agonică, mai ales la anergici, caşectici şi canceroşi sau curînd după moarte.

La necropsie, în timpul manoperelor, suprafaţa organelor se contaminează cu fel de fel de germeni şi, din această cauză, pentru a putea face o recoltare corectă se „prăjeşte" o porţiune din suprafaţa organului, care va fi explorat (de ex., inimă, plămîn, ficat, splină etc.), prin aplicarea unei spatule sau palete metalice înfierbîntate la flacără. Prin mijlocul acestei porţiuni, se introduce fie un ac gros, fie o pipetă Pasteur cu vîrful mai gros, cu care se aspiră, după caz, sînge, pulpă sau suc tisular, cu care se fac *frotiuri* şi *culturi* pe medii variate cu sînge şi fără sînge, medii aerobe şi anaerobe şi, eventual, şi pe medii pentru fungi. Cu fragmente de ţesut, se pot face *amprente* pe lame de sticlă portobiect, care vor fi ulterior colorate cu albastru de metilen, cu Gram, cu Ziehl (eventual şi cu alte coloraţii) şi examinate. În continuare, mici fragmente pot fi însămînţate pe diferite medii sau mojarate steril şi apoi însămînţate pe medii sau *inoculate* la animale de laborator (fig. 59).

Pentru cercetări *histopatologice,* se prelevează la necropsie (sau uneori şi din piese de exereză chirurgicală) fragmente de aprox. 10×20×5 mm sau chiar de 2—3 cm^3, care vor fi imediat cufundate într-un lichid fixator, la indicaţia laboratorului de anatomie patologică.

Pentru cercetări *microbiologice,* piesele de necropsie sau de biopsie se prelevează steril şi se plasează într-o cutie Petri sterilă, în care se va plasa în prealabil, o foaie de hîrtie de filtru, pe care se adaugă cîteva

picături de apă sau de soluție sterilă clorurosodică 8,5 g/1 000 ml, pentru a evita uscarea în timpul transportului.

De cele mai multe ori, este necesar să se facă în paralel cercetări histopatologice și microbiologice. În aceste cazuri, de îndată ce piesa

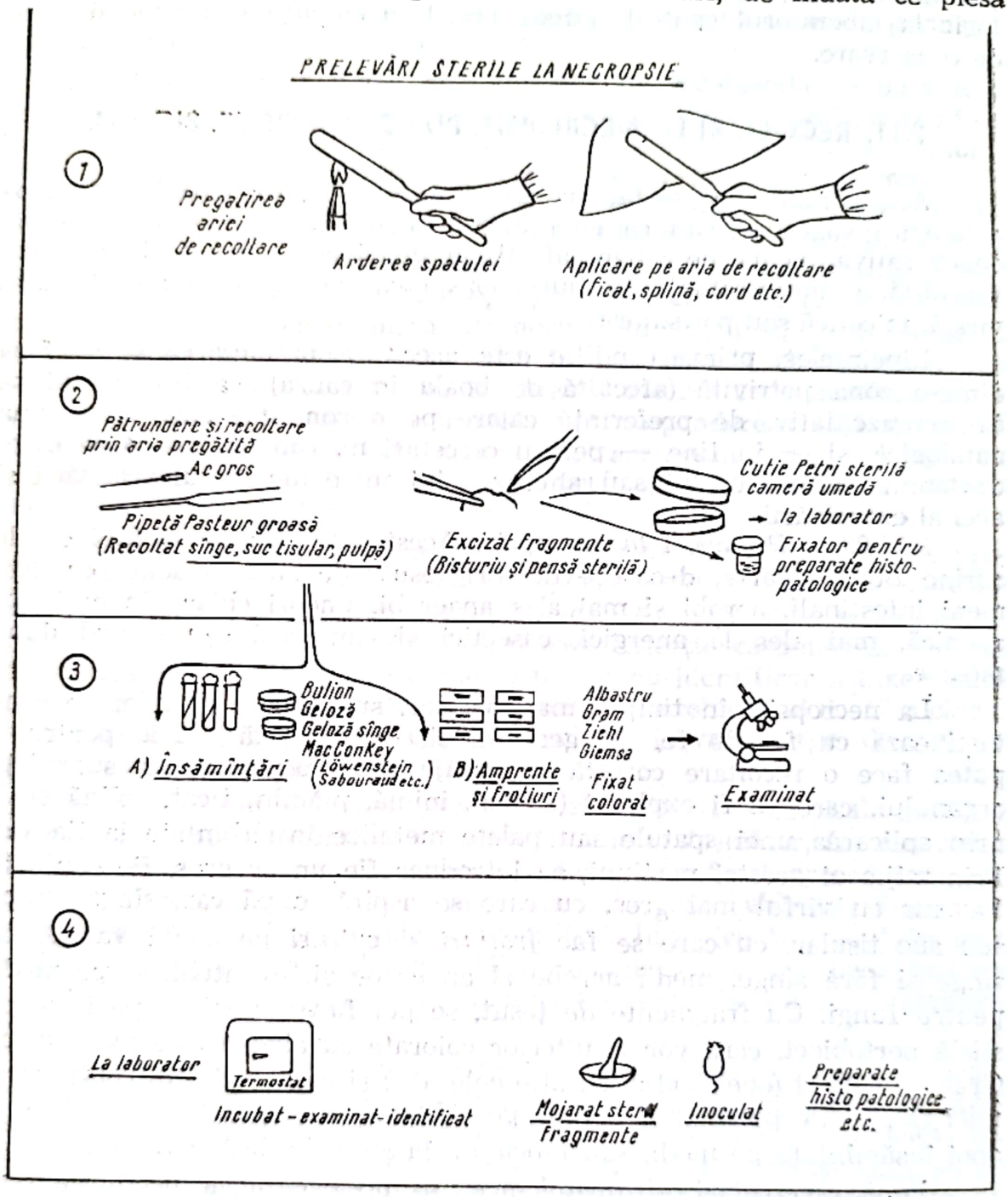


Fig. 59. — Prelevări sterile la necropsie.

sosește la laborator, ea va fi orientată și secționată cu instrumente sterile în două porțiuni, ambele reprezentative, adică să conțină aceleași elemente.

2.11.0.0.2. Biopsii și puncții bioptice. O serie de agenți patogeni se localizează fie direct, fie după o diseminare hematogenă sau limfatică,

Scanned with OKEN Scanner

în diferite țesuturi sau organe uneori cu precădere pentru anumite organe „țintă", ca de ex., în plămîn, pericard, ganglioni limfatici, ficat, splină, măduva osoasă, mușchi, articulații, sistem nervos și altele. Deseori, ei nu pot (sau nu mai pot) fi decelați decît acolo.

Aceste localizări se pot frecvent manifesta prin semne clinice, radiologice sau prin anumite alte explorări paraclinice. Orice abces, colecție sau țesut mortificat depistat trebuie puncționat și asanat (eventual chirurgical). Produsul extras este examinat *macroscopic, microscopic,* colorat cu albastru de metilen, cu Gram și cu Ziehl, și *însămînțat pe medii de cultură* pentru piogeni, pentru germeni intestinali aerobi și anaerobi, pentru micobacterii și, eventual, pentru fungi. Uneori, semne de inflamație, tumefacții, dureri sau scurgeri patologice, permit orientarea și localizarea intervenției de prelevare. Alteori, însă, localizările sînt mute și cercetările prin puncții și biopsii trebuie făcute pe baza explorărilor clinice și paraclinice și a prezumțiilor și a observațiilor, în cazuri similare.

În cursul unor septicemii, ca de ex. cu stafilococi, agenții microbieni pot fi evidențiați în toate țesuturile, alteori însă există un tropism particular. Astfel, însămînțările mai frecvente cu stafilococ sînt în oase, plămîn, pleură și rinichi. Alți germeni nu pot fi evidențiați practic decît în anumite localizări, deoarece faza de diseminare hematogenă și posibilitatea de a-i cultiva prin hemoculturi este trecătoare și aleatorie. Vom da cîteva exemple :

— *Splina* poate găzdui cele mai variate specii microbiene, micotice și parazitare. În plus, splina poate prezenta unele leziuni hematologice și histopatologice foarte sugestive sau chiar caracteristice pentru unele afecțiuni. Din această cauză, examenul splinei este obligatoriu la necropsie. În cursul vieții, puncția splenică este de regulă contraindicată la noi în țară și în regiunile temperate, din cauza pericolului de hemoragie, ruptură de splină sau puncție accidentală a unui chist hidatic splenic.

Puncția splenică poate fi practicată, cu unele precauții, în unele splenomegalii cronice scleroase, ca în malaria cronică și în leishmanioză (Kala-Azar).

Majoritatea germenilor, care pot fi evidențiați în splină, se pot găsi și în măduva osoasă și în ganglionii limfatici, a căror puncție este mai ușoară și mai lipsită de pericole.

— *Ganglionii limfatici* pot găzdui cele mai variate specii de bacterii (piogeni, bacili Koch, germeni grampozitivi, și gramnegativi, Francisella tularensis, bacilul pestos etc., precum și toxoplasme, histoplasma, leishmania, filarii, tripanosome, bacilii leprei etc.).

— *Măduva osoasă* poate găzdui, printre germenii citați mai sus, și bacilul tific, care uneori nu mai poate fi izolat decît din măduva osoasă.

— *Ficatul.* Prin examenul morfopatologic, macroscopic și microscopic în ficat se pot pune în evidență, pe lîngă modificările histopatologice (în : hepatite virale, acute și cronice, ciroze, steatoze, procese proliferative și granulomatoase neinfecțioase), și elemente dovedind unele infecții, ca : foliculi tuberculoși, abcese cu piogeni, abcese ami-

Scanned with OKEN Scanner

biene și/sau cu germeni intestinali aerobi și anaerobi, precum și paraziți ca lamblia, Fasciola hepatica etc.

— *Plămîn și pleură.* Puncția și biopsia pleurală se practică relativ ușor, dacă există un revărsat pleural ; biopsia pulmonară însă se face cu ocazia unei intervenții chirurgicale, de obicei toracotomie și, rareori și riscant, prin puncție.

Pe lîngă toți germenii, capabili să dea pneumopatii acute și cronice, menționate la examenul sputei, mai citățm paraziți și larve (unele în timpul migrării lor prin plămîn ca : ascarizi, Ancylostoma, Strongyloides, Paragonimus, Pneumocystis carinii). În fine, în plămîn, se mai pot localiza infecțiile grave, pestoasă, morvoasă și o boală denumită „a legionarilor", datorată unui bacil gramnegativ, denumit Legionnella pneumophila, greu de pus în evidență.

— *Articulațiile* și lichidul sinovial pot prezenta infecții cu piogeni, cu bacili Koch, cu neisserii etc.

— *Țesutul osos* poate fi infectat cu piogeni, în special cu stafilococ, bacili enterali, bacili Koch, bacili tifici (osteomielite cronice, uneori asimptomatice), brucele etc.

— *Biopsia musculară* este, uneori, indispensabilă pentru diagnosticul trichinozei. Ea este folosită, de asemenea, mult mai frecvent pentru diagnosticul poliarteritei nodoase, polimiopatiei, vascularitelor, afecțiuni care pot fi, deseori, confundate cu infecții bacteriene.

— În fine, în *piele* și în *mucoase,* pe lîngă germenii piogeni banali, se pot evidenția spirochete, leishmanii, tripanosome, agenții șancrelor veneriene și, în mucoasa nazală, bacili leproși.

2.11.0.0.3. Examenul bacteriologic pe secțiuni. Din toate aceste prelevări, se fac totdeauna un *examen macroscopic* sau cu lupa, apoi *microscopic,* cu mărire mică, apoi cu mărire mijlocie și, în fine, cu imersie a preparatului nativ și colorat cu albastru de metilen, cu Gram, cu Ziehl și, deseori, și cu Giemsa. Pentru examenul microscopic, se fac *frotiuri* sau *amprente* (o mică porțiune de țesut strivită sau aplicată pe o lamă de sticlă portobiect) sau se fac incluzionări și *secțiuni,* care vor trebui ulterior colorate.

Punerea în evidență a bacteriilor grampozitive și gramnegative în amprente nu prezintă de obicei dificultăți, dacă frotiul este destul de subțire și dacă nu s-a făcut o colorare prea intensă, mai ales pentru colorarea de fond (roșu pentru Gram și albastru pentru Ziehl).

Punerea în evidență a germenilor pe secțiuni poate prezenta însă dificultăți și, din această cauză, redăm aci alăturat două tehnici speciale, una pentru colorarea cu Gram și alta pentru colorarea cu Ziehl.

2.11.0.0.3.1. Coloratia Gram pe secțiuni la parafină.* Preparatele sînt fixate în formalină 10/100, incluzionate, secționate, montate pe lame portobiect. Se deparafinează în mod obișnuit.

Se colorează 10 minute în soluția nr. 1 ; se spală în apă distilată ; se diferențiază în formalină concentrată cîteva minute ; se spală cu apă distilată ; se tratează cu soluție nr. 2, timp de 3—5 minute ; se spală cu apă distilată, se diferențiază cu alcool 95/100 ; se spală cu

* Coloratia nu a fost controlată personal.

apă ; se colorează 3 minute, cu soluţia nr. 3 ; se spală cu apă distilată ; se tratează 1 minut, cu soluţia nr. 4 ; se spală cu apă distilată ; se usucă cu hîrtie de filtru, dar se lasă încă umed ; se tratează, de mai multe ori, cîteva secunde-minute cu soluţia nr. 5 ; se tratează cu xilol ; se montează. Germenii gramnegativi apar coloraţi în roşu, celelalte elemente şi ţesuturi apar de diferite nuanţe de roşu-violet, iar germenii grampozitivi apar coloraţi în albastru.

Soluţia nr. 1

Fucsină bazică 0,59 g
Anilină 1 ml
Fenol cristalizat topit 1 ml
Alcool 30/100 v/v în apă

Soluţia nr. 2

Acid picric 0,18 g
Apă distilată 100 ml

Soluţia nr. 3

Violet de genţiană sau cristal violet 5 g
Alcool absolut 10 ml
Anilină 2 ml
Apă distilată 88 ml

Soluţia nr. 4

Iod 1 g
Iodură de potasiu 2 g
Apă distilată 300 ml

Soluţia nr. 5

Anilină 50 ml
Xilol 50 ml

2.11.0.0.3.2. Coloraţia Ziehl pentru secţiuni la parafină *. Se deparafinează, apoi se tratează 1 oră la temperatura camerei cu soluţia nr. 1 ; se diferenţiază de 2 ori, pînă ţesutul rămîne roz-palid cu soluţie nr. 2 ; se spală bine cu apă de robinet ; se colorează de fond cîteva secunde cu soluţia nr. 3 ; se spală deshidratat ; se clarifică ; se montează.

Bacilii alcooloacidorezistenţi apar coloraţi în roşu aprins, iar fondul apare colorat în albastru.

Soluţia nr. 1

Fucsină bazică 4 g
Fenol cristalizat topit 8 ml
Alcool 95/100 v/v 20 ml
Apă distilată 100 ml

* Coloraţia nu a fost controlată personal.

Soluția nr. 2

Acid clorhidric concentrat 1 ml
Alcool 70/100 v/v 99 ml

Soluția nr. 3 (soluție stoc)

Albastru de metilen 1,4 g
Alcool 95/100 v/v 100 ml

Soluția nr. 3 (soluție de lucru)

Soluție stoc 10 ml
Apă distilată 90 ml

Scanned with OKEN Scanner

3. PRINCIPALII AGENȚI PATOGENI

3.1. OBSERVAȚII GENERALE

Sînt multe mii de feluri de agenți patogeni și condiționat patogeni, unii de largă răspîndire în natură, alții cantonați numai la purtători, la bolnavi și intermediari, sau limitați la anumite focare naturale. Mulți sînt *saprofiți*, *condiționat patogeni-oportuniști* sau *patogeni*, pentru animale și om. Mai puțini sînt, de regulă, patogeni pentru om și încă mai puțini sînt specifici omului.

Uneori, datele epidemiologice și simptomatologia clinică sînt destul de caracteristice, pentru a se deduce care este agentul etiologic. Alteori, însă, aceeași simptomatologie clinică poate fi pricinuită de diferiți agenți sau simptomele prezentate de bolnav nu sînt caracteristice. În toate acestea din urmă situații, este necesar să se poată izola și identifica agentul patogen. Izolarea agentului este deseori necesară, chiar dacă se suspectează identitatea lui taxonomică, fie pentru a se putea determina sensibilitatea lui la diferiți agenți antimicrobieni, fie în scop științific, fie statistic, fie pentru a putea să se aleagă un tratament cu mai mari șanse de succes.

Identificarea taxonomică a agenților patogeni și studiul detaliat al caracterelor lor cade în sarcina nemijlocită a microbiologilor clinici (bacteriologi, virusologi, parazitologi, micologi).

Clinicianul, însă trebuie să cunoască *modul corect de recoltare a produselor patologice*, care ar putea conține agenți patogeni, să recunoască doar *caracterele microscopice* (morfologice și tinctoriale) *ale germenilor* mai des întîlniți, în special în bolile grave, și este de dorit să cunoască aspectul coloniilor microbiene crescute primar pe mediile uzuale de cultură.

„Alfabetul" clinicianului în bacteriologie este redus doar la puține caractere și anume : dimensiunea și forma agenților patogeni observați la microscop (coci, bacili, capsulați sau nu, cu sau fără spori), aranjarea și gruparea lor (în grămezi, în lanțuri, cîte doi etc.). Aprecierea unor caractere tinctoriale (grampozitiv sau gramnegativ ; acidoalcoolorezistent), uneori constatarea că unii germeni se observă la microscop în produsul

patologic, dar nu cresc pe medii uzuale (germeni „pretenţioşi" sau anaerobi). Clinicianul mai poate recunoaşte unele caractere observate prin creşterea germenilor pe medii uzuale, cum ar fi medii cu sînge sau medii lactozate, cu un indicator de pH.

Hemoliza produsă de unii germeni pe mediile cu sînge poate fi de mai multe feluri şi influenţată de provenienţa sîngelui folosit, de compoziţia mediului şi de condiţiile de incubare (în aerobioză, în atmosferă cu CO_2, în anaerobioză sau după păstrarea culturii peste noapte la frigider). Pentru studiul hemolizei, se recomandă utilizarea unui mediu gelozat bun, fără glucoză, cu pH 7,3—7,4 şi cu 5% sînge defibrinat de oaie. Germenii pot produce diferite feluri de hemoliză şi anume :

— *hemoliză* α (alfa), o zonă mică, difuză, care nu este delimitată bine de liza parţială a eritrocitelor, cu o culoare verzuie sau brună, în imediata vecinătate a coloniilor ;

— *hemoliză* β (beta), liză completă a eritrocitelor pe o zonă perfect clară, bine distinctă în jurul coloniilor (uneori mai bine vizibilă în jurul coloniilor dezvoltate în grosimea gelozei, în cazul utilizării unei tehnici speciale, care se execută de regulă numai în laboratorul central sau de profil) ;

— *hemoliză* γ *(gamma),* la care nu se observă nici un fel de modificare în jurul coloniilor ;

— *hemoliză* α′ (alfa prim), zonă îngustă de hemoliză în jurul coloniilor, înconjurată cu o zonă mai mare de hemoliză β (poate fi confundată cu hemoliza β).

Atragem încă o dată atenţia asupra necesităţii executării de frotiuri şi colorații Gram din coloniile dezvoltate pe medii de cultură. Dacă ne mulţumim cu caracterul macroscopic al acestora, putem confunda un streptococ β-hemolitic patogen cu un *Haemophilus haemolyticus* (comensal al faringelui), precum şi cu un pneumococ (diplococ grampozitiv, α-hemolitic), cu o listerie (cocobacil) etc.

Bineînţeles că datele sumare, care sînt la îndemîna clinicianului, nu permit nici pe departe identificarea taxonomică, nici măcar a majorităţii agenţilor patogeni (în special, bacili gramnegativi) ; totuşi, folosirea lor raţională, în contextul epidemiologic şi clinic, permite de multe ori în scurt timp, fie să se îndepărteze unele suspiciuni, fie să se limiteze posibilităţile etiologice, fie uneori chiar să se asigure un diagnostic etiologic şi să se instituie în mod precoce un tratament raţional. Iată cîteva exemple : angina fuzospirilară, abcesele stafilococice sau streptococice, meningita pneumococică sau neisseriană, uretrita acută gonococică la un bărbat, spirochetoza, malaria, tripanosomiaza, schistosomiaza etc.

Clasificarea taxonomică a germenilor şi studiul lor cade în sarcina microbiologilor, iar clinicianul nu trebuie să se mulţumească cu o impresie pripită, ci să colaboreze în continuare cu specialiştii de laborator.

Clasificarea germenilor în special a bacteriilor şi a virusurilor nu este în unele cazuri definitiv stabilită şi nomenclatura unor germeni poate fi controversată sau schimbată în decursul anilor. În cele ce

Scanned with OKEN Scanner

urmează, nu ne vom opri decît asupra germenilor mai des întîlniți, folosind o clasificare foarte simplistă, bazată pe „alfabetul" mai sus amintit și pe unele analize simple, care sînt la îndemîna clinicianului.

Orice germen (sau bănuit ca atare) *văzut într-un produs patologic sau crescut pe un mediu de cultură, dar nerecunoscut de examinator, trebuie neapărat supus ulterior examenului competent și complet al medicilor specialiști de laborator clinic.*

Examenul microscopic morfotinctorial, direct, al unor produse patologice, cu toată valoarea lui, are posibilități diagnostice limitate. El poate recunoaște și, deseori, poate identifica corect paraziți din tractul digestiv și genital, precum și paraziți sistemici, dar nu poate face întotdeauna (uneori, chiar niciodată) diferențierea dintre diverși coci grampozitivi văzuți izolat (cu excepția pneumococilor încapsulați), a cocilor gramnegativi, a cocobacililor grampozitivi și gramnegativi, precum și a bacililor gramnegativi (fig. 60) (poate cu excepția klebsielelor încapsulate). De asemenea, nu poate face nici diferențierea între diverși bacili acidoalcoolorezistenți. Nu se pot practic recunoaște rickettsii, chlamidii, micoplasme și, mai ales, virusuri. Menționăm că, în unele viroze (infecții cu virusul citomegalic, în unele viroze veziculare și în unele viroze respiratorii), se pot observa unele modificări citopatologice caracteristice sau cel puțin negative.

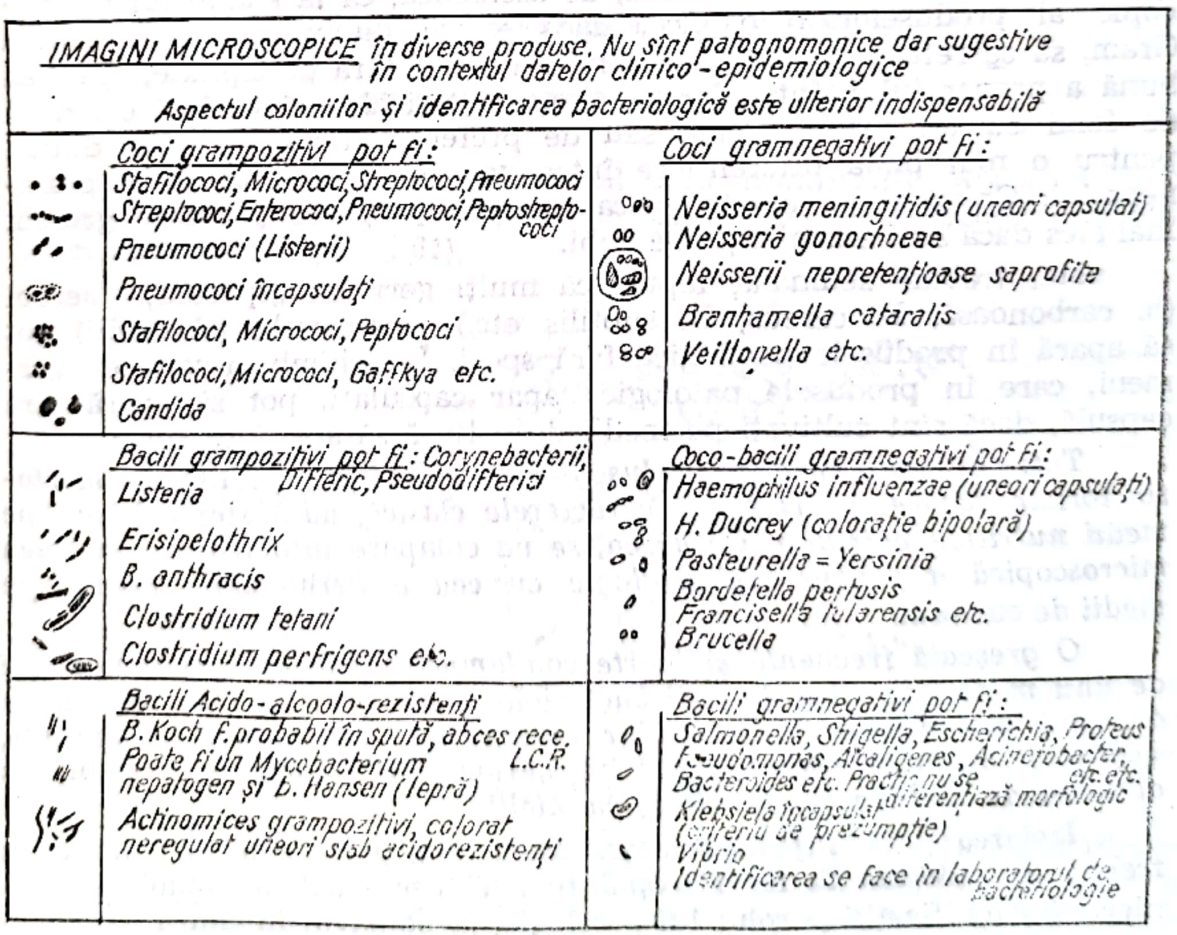


***Fig. 60.** — Imagini microscopice nepatognomonice, dar sugestive, în diverse produse.*

Morfologia și mai ales caracterele tinctoriale prin coloraţia Gram ale unor germeni observaţi direct în produsele patologice (mai ales dacă bolnavul a primit antibiotice sau a dezvoltat anticorpi specifici) pot fi înșelătoare. Se pot observa : forme cocobacilare ale unor bacili, care pot fi confundate cu coci ; germeni pleomorfi, forme filamentoase ale unor bacili gramnegativi, la bolnavii trataţi cu ampicilină. De asemenea, bacteridia carbonoasă (mai ales în forme ușoare sau tratate cu antibiotice sau la bolnavii cu anticorpi specifici) poate să-și piardă coloraţia Gram, în mod neregulat, putînd simula un lanț scurt de streptococi. Uneori, germenii grampozitivi nu sînt bine coloraţi și pot fi confundaţi cu germenii gramnegativi.

Aceasta se poate întîmpla mai ales în produsele patologice cu pH acid și, din această cauză, s-a recomandat o ușoară alcalinizare a violetului de genţiană, făcută extemporaneu pe lamă, cu o picătură dintr-o soluţie de bicarbonat de sodiu 10/100.

Dacă coloraţia de fond (în special cu fucsină) este prea intensă, uneori este dificil de precizat dacă bacteria examinată este gramnegativă sau grampozitivă. De asemenea, unii germeni (în special cocii și cocobacilii gramnegativi) intracelulari se deosebesc greu de citoplasma celulară colorată și ea în roșu. Din această cauză, se recomandă ca întotdeauna să se compare frotiul colorat cu Gram cu unul colorat cu albastru de metilen. Recomandăm, de asemenea, ca la examenul microscopic al produselor patologice, dacă există dubiu asupra coloraţiei Gram, să se refacă coloraţia, folosind un violet fără precipitate, spălarea bună a preparatului, între fiecare timp, și mai ales să se facă coloraţia de fond cu un roșu (fucsină sau de preferat safranină) mult diluat, pentru o mai bună diferenţiere între germenii grampozitivi și gramnegativi. Chiar și cu aceste precauţii, nu rareori se pot face greșeli, mai ales dacă sînt examinaţi anaerobi.

Mai trebuie semnalat faptul că mulţi germeni „sporulaţi“ aerobi (b. carbonoasă, B. cereus, B. subtilis etc.) și anaerobi (clostridii) pot să apară în produsele patologice fără spori. În schimb, o serie de germeni, care în produsele patologice apar capsulaţi, pot să apară fără capsulă, dacă sînt cultivaţi pe medii de cultură sărace, fără sînge.

Toţi germenii, care în produsele patologice pot avea aspecte morfotinctoriale atipice, își recapătă caracterele clasice, dacă sînt cultivaţi pe medii nutritive potrivite. De aceea, se va compara întotdeauna imaginea microscopică a produsului patologic cu cea a germenilor crescuţi pe medii de cultură.

O greșeală frecventă și foarte condamnabilă, făcută din comoditate de unii medici și chiar de unii bacteriologi, este de a se bizui numai pe aspectul macroscopic al coloniilor crescute pe diferite medii speciale, neglijînd examenul microscopic al germenilor coloraţi cu Gram, cu albastru de metilen și, eventual, cu Ziehl.

Izolarea și *identificarea* ulterioară a unui germen la un bolnav nu trebuie considerată ca fiind scopul final al cercetării microbiologiei clinice, ci semnificaţia și rolul lui patologic, la bolnavul în cauză, și determinarea sensibilităţii lui la substanţe antimicrobiene. De ex., o diaree

Scanned with OKEN Scanner

infantilă, la care nu se izolează „germeni patogeni", poate fi pricinuită de Escherichia coli cu enterotoxină, dar care nu este etichetat serologic ca patogen. Uneori, la un bolnav la care se izolează din scaun o specie de Salmonella, se poate ca aceasta să nu fie cauza unei tulburări digestive acute, ci adevărata cauză să fie un virus. Unele izbucniri epidemice de infecţii de spital pot fi pricinuite de perfuzii cu lichide nesterile (glucozat, aminoacizi sau sînge). Infecţii repetate, uneori puţin zgomotoase, pot fi pricinuite de persistenţa unui focar septic nedecelat, a unui corp străin sau a unui proces neoplazic.

Rolul patogen al unor eventual oportunişti (condiţionat patogeni), decelaţi într-un produs patologic este de multe ori greu de interpretat. În toate aceste cazuri, colaborarea inteligentă între clinician şi omul de laborator poate fi de cel mai mare folos.

3.2. DESCRIEREA SUMARĂ A PRINCIPALILOR GERMENI

(folosind tehnicile sumare care stau la îndemîna clinicienilor)

Identificarea precisă şi studiul caracterelor germenilor cade în sarcina microbiologilor.

3.2.1. BACTERII ŞI INFECŢII BACTERIENE

3.2.1.1. COCI GRAMPOZITIVI AEROBI ŞI ANAEROBI

În clinică, interesează în special cocii grampozitivi aşezaţi *în grămezi* (Staphylococcus), în *lanţuri* (Streptococcus) şi *diplococii* (Streptococcus pneumoniae) (fig. 61).

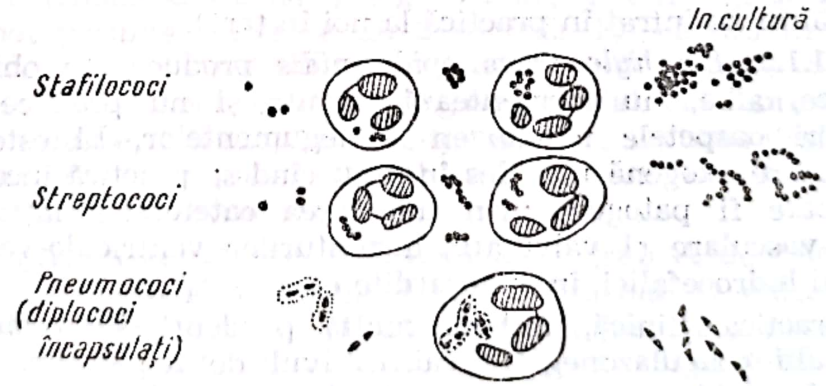


Fig. 61. — Coci grampozitivi aerobi în produse patologice. Cocii grampozitivi anaerobi (Peptococcus etc.) au aceeaşi morfologie. Capsula este figurată punctat.

3.2.1.1.1. Stafilococii, mai des întîlniţi în practică sînt reprezentaţi de 3 specii aerobe principale, şi anume : *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophytius.* Ei nu pot fi deosebiţi, uneori, în produsele patologice de alţi coci grampozitivi.

3.2.1.1.1.1. Staphylococcus aureus. Acești stafilococi sînt germeni sferici, de 0,7—1,2 μm ∅, care uneori în culturi tinere pot să prezinte o capsulă. Ei produc pe geloză colonii mari (de peste 1 mm ∅), opace, de obicei galbene-aurii. Pe medii cu sînge, pot produce o zonă relativ îngustă de β-hemoliză. Sînt coagulazopozitivi și, de obicei, fermentează manita.

Decelarea coagulazei se poate face comod pe o lamă portobiect, pe care se depune o picătură dintr-o suspensie omogenă și groasă din stafilococul de cercetat în ser fiziologic. Se adaugă o picătură de plasmă umană (supranatantul de la o viteză de sedimentare a eritrocitelor, mai bine de la sînge recoltat pe EDTA). Se amestecă bine. Dacă stafilococii nu coagulază, se produce în maximum 5 minute o coaglutinare în grămezi grosolane, bine vibile cu ochiul liber.

Stafilococul auriu poate fi izolat de la persoane sănătoase, de pe tegumentele externe și de pe mucoasa nazală. El este des patogen, putînd produce : pustule, furuncule, infecții ale pielii, impetigo, pemfigus la nou-născuți, abcese și flegmoane, flebite, pneumonii, empieme pulmonare, pleurezii purulente, abcese renale, osteomielite, meningite, septicemii, endocardite etc. Multiplicarea stafilococilor în unele alimente permite eliberarea unei enterotoxine, care poate produce toxiinfecții alimentare. Uneori, produc o eritrotoxină, responsabilă de sindromul scarlatinei stafilococice.

Sensibilitatea stafilococilor la antibiotice este variabilă ; astăzi, peste 3/4 din stafilococii sălbatici și peste 80% din cei de spital sînt rezistenți la penicilină G (benzilpenicilina), majoritatea datorată unei penicilinaze secretate de ei.

Antibiograma este obligatorie și, deseori, este necesară cercetarea penicilinazei, înainte de a începe un tratament cu antibiotice. Antibioticele probabil utile sînt : oxacilina, eritromicina, clindamicina, vancomicina și poate și cefamicinele (cefoxitina, cefatoxina, L.Y. 127935, care deocamdată nu au intrat în practică la noi în țară).

3.2.1.1.1.2. Staphylococcus epidermidis produce, de obicei, colonii mari, opace, albe, nu fermentează manita și nu produce coagulază. Este deseori oaspetele nepatogen al tegumentelor. El este germenul de contaminare exogenă mai des întîlnit, cînd se practică incorect hemoculturi. Poate fi patogen, prin infectarea cateterelor intravenoase, a protezelor vasculare și valvulare, a șunturilor ventriculo-vasculare din tratamentul hidrocefaliei, în endocardite etc.

În practica clinică, trebuie multă prudență în atribuirea unui stafilococ alb coagulazonegativ calificativul de nepatogen, germen de suprainfecție accidentală a unui mediu de cultură. Invers, trebuie multă prudență în recunoașterea rolului acestui stafilococ patogen în alte cazuri. În cazurile cînd se suspectează că are un rol patogen, se va cerceta sensibilitatea lui la antibiotice.

3.2.1.1.1.3. Staphylococcus saprophyticus se aseamănă mult cu Staph. epidermidis : ambii sînt coagulazonegativi, saprofiți ai tegumentelor, nepatogeni, de cele mai multe ori, pot fi germeni de contaminare a hemoculturilor și a cateterelor. Ei pot deveni patogeni, producînd de

obicei infecții mai trenante și mai puțin acute, decît cele produse de stafilococul auriu. Pot produce infecții urinare.

3.2.1.1.1.4. Stafilococii anaerobi (Peptococcus) nu pot fi deosebiți morfologic de cei aerobi, prezența lor poate fi bănuită, prin faptul că pot fi vizibili într-un produs patologic de obicei fetid, dar nu cresc pe medii uzuale (dacă bolnavul a fost tratat cu antibiotice active, se poate întîmpla să se observe și stafilococi aurii într-un produs și care să nu crească pe mediu de cultură aerobă). Stafilococii anaerobi pot fi izolați în infecții mixte cu diverși alți anaerobi, în cazul unor infecții cu punct de plecare bucofaringian, otic, abdominal, genital (mai ales la femei) sau în infecțiile plăgilor contuze. Sînt de obicei, sensibili la penicilină, cloramfenicol și metronidazol.

3.2.1.1.2. Streptococii sînt sferici, uneori ușor eliptici, de 1,2/0,7 μm ∅, grampozitivi și, în forma lor patogenă în organism și în produse patologice, apar deseori înconjurați de o capsulă discretă. Uneori, sînt izolați, mai des aranjați cîte 2 sau cîte 3 sau în lanțuri scurte. În medii lichide, pot să apară în lanțuri lungi (vezi fig. 61). Pot fi cultivați numai pe medii relativ bogate (glucozate, cu sînge), cu excepția streptococului fecal (enterococului), dînd colonii mici (sub 1 mm ∅). Nu sînt solubili în săruri biliare, cu excepția lui Streptococcus pneumoniae (pneumococul). Nu sînt sensibili la bacitracină, cu excepția streptococului piogen beta-hemolitic grup A, și nici la optochin, cu excepția pneumococului. Pe medii cu sînge de oaie, pot produce hemoliză de tip β,α și γ.

3.2.1.1.2.1. Streptococii β-hemolitici pot fi, din punct de vedere antigenic, grupați în mai multe grupe Lancefield : A, B, C, D, etc.

— *Streptococii piogeni β-hemolitici* grup A sînt cu mult cei mai des întîlniți în patologia umană. Se pot găsi, de obicei în proporție foarte mică, pe tegumente și pe mucoasa bucofaringiană și pe cea vaginală la femei. Culturile pe geloză-sînge, din regiunile mai sus amintite, pot permite creșterea de 2—3 (sub 10) colonii de streptococi β-hemolitici, ceea ce nu justifică un diagnostic de infecție streptococică Streptococii piogeni pot produce angine, scarlatină, febre puerperale, pneumonii, celulite, miozite, limfangite, erizipel, septicemii și meningite. Infecțiile streptococice pot fi urmate de reumatism articular acut, de glomerulonefrită și de coree.

Diferențierea streptococilor β-hemolitici grup A de celelalte grupe se face cel mai comod prin *testul cu bacitracină.* O cultură pură de streptococ β-hemolitic este inoculată abundent (pentru a produce colonii confluente) pe suprafața umedă (nu uscată) a unei geloze-sînge. Se aplică apoi un disc cu 0,04 U. bacitracină pe disc (nu cu 10 U. ca pentru antibiogramă), păstrat în condiții corespunzătoare. După 24 de ore de incubație, apare o zonă de 10—20 mm ∅ de inhibiție, dacă este vorba de streptococ β-hemolitic grup A (rezultate false în 5—10% din cazuri). Streptococii β-hemolitici grup A sînt constant sensibili la penicilină, eritromicină, cefalotină.

— *Streptococii piogeni β-hemolitici grup B* (insensibili la bacitracină), de obicei sînt nepatogeni pentru omul adult, sînt saprofiți și

patogeni pentru animale (Streptococcus agalactiae), putînd produce mastita vacilor, infecții diverse și septicemii. La om, poate fi izolat ca saprofit și potențial patogen din faringe, din urină, din tractul genital la femei. La nou-născut (mult mai rar la adult) poate produce septicemii, endocardite, meningite, infecții ale căilor respiratorii, infecții urinare și nefrite.

— *Streptococii β-hemolitici grup C* pot avea la om aceleași caractere de saprofiție și oportunism, ca cei din grupul B.

— *Streptococii grup D* (enterococii) sînt de obicei α- sau γ-hemolitici, excepțional și β-hemolitici (vezi mai departe la *3.2.1.1.2.2.*)

3.2.1.1.2.2. Streptococii α-hemolitici și *γ-hemolitici* cuprind germeni care sînt în general saprofiți nepatogeni ai cavității bucale, eventual ai tractului respirator superior (Streptococcus salivarius ; Streptococcus M. G. ; Str. sanguis, Str. mitis și Str. mutans). Toți pot produce, în anumite condiții, endocardite bacteriene subacute, infecții respiratorii și infecții ale unor plăgi muşcate. Nu se deosebesc morfologic între ei și nici cultural pe geloză-sînge. Sînt des microaerofili.

3.2.1.1.2.3. Streptococcus faecalis (enterococ) are aceeași morfologie, produce pe geloză—sînge colonii mai mari, crește pe medii ușor selective pntru germeni intestinali (de ex., Mac Conkey), pe medii cu bilă și rezistă 30 minute la 60°C. Enterococii sînt, de regulă, rezistenți la penicilina G (benzilpenicilină). Sînt saprofiți ai tractusului digestiv și potențial patogeni (angiocolecistite, infecții urinare, septicemii, endocardite bacteriene subacute).

3.2.1.1.2.4. Streptococii anaerobi (Peptostreptococcus) se izolează din colecții purulente fetide, deseori din infecții mixte cu alți anaerobi. Majoritatea sînt sensibili la penicilină, clindamicină, cloramfenicol, metronidazol.

3.2.1.1.2.5. Streptococcus pneumoniae (pneumococ). Sînt coci gram-pozitivi lanceolați, de 1,4/0,8 μm ∅, de obicei grupați în diplo (împerecheați prin extremitatea mai groasă), uneori izolați sau în lanțuri scurte (în medii lichide). În produsele patologice proaspete, apar înconjurați de o capsulă, de obicei vizibilă la microscop, dacă se coboară puțin condensatorul (vezi fig. 61). Pneumococii sînt oaspeții obișnuiți ai cavității bucale și ai căilor respiratorii superioare, la 30—70% din adulți. Pot produce infecții ale căilor respiratorii inferioare (aprox. 80% din pneumoniile acute sînt pneumococice și des precedate de o perioadă de bacteriemie). Pot produce și pleurezii, peritonite (mai ales la copil), endocardite, pericardite, meningite, artrite etc., precum și otite, mastoidite și sinuzite.

Pneumococii cresc pe *medii îmbogățite*, cu 5% sînge defibrinat de oaie, cal sau iepure, sau medii cu sînge „șocolată". Cresc mai bine în atmosferă cu CO_2 (în vas cu „lumînare").

Pe medii cu sînge, coloniile sînt de obicei de 1 mm ∅, plate, înconjurate de o zonă de α-hemoliză. Pneumococii sînt solubili în *sărurile biliare* (se acoperă o colonie suspectă de pe geloză-sînge cu o picătură dintr-o soluție 10% dezoxicholat de sodiu și se constată repede dizolvarea pneumococilor). Pneumococii sînt inhibați de *optochină* ;

pentru aceasta, se însămînţează bogat un mediu geloză-sînge cu germenul de cercetat, se plasează un disc de 6 mm ∅, care conţine 5 µg ethilhidrocupreină HCl (optochin) şi se incubează aerob la 35° peste noapte. Creşterea pneumococilor este inhibată pe un diametru de peste 18 mm. Pneumococii încapsulaţi (din produse patologice sau din culturi pe medii bogate în glucoză şi sînge), puşi în contact cu seruri autospecifice, produc o umflare caracteristică a capsulei.

Pneumococii sînt de obicei foarte sensibili la penicilina G, mai puţin la eritromicină, la sulfamide şi la cotrimoxazol. În ultimii ani, au apărut din ce în ce mai des, în unele ţări, tulpini de pneumococi rezistenţi la penicilină, a căror proporţie poate ajunge la aprox. 1/3.

Cocii grampozitivi, în special pneumococii, pot fi uneori confundaţi la un examen mai superficial cu cocobacilii grampozitivi sau alţi bacili grampozitivi pleomorfi (vezi 3.2.1.7.).

3.2.1.2. COCI GRAMNEGATIVI AEROBI ŞI ANAEROBI *

Cocii gramnegativi apar izolaţi, mai des grupaţi cîte doi (diplococi) sau în mase. Diplococii sînt deseori dispuşi în boabe de cafea, mai turtiţi în partea învecinată, de dimensiuni 0,6—0,8 µm (fig. 62). Diplococii gramnegativi pot fi, uneori, confundaţi cu cocobacilii gramnegativi sau cu unii bacili gramnegativi scurţi şi pleomorfi *.

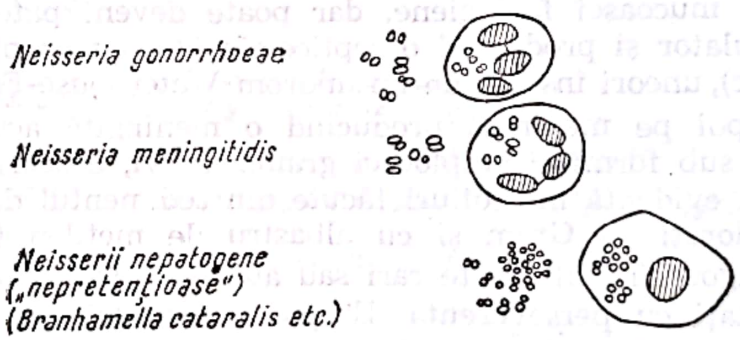


Fig. 62. — Diplococi gramnegativi aerobi în produse patologice. Cocii gramnegativi anaerobi (*Veillonella* etc.), în perechi şi lanţuri scurte, nu au caraçtere morfologice speciale.

3.2.1.2.1. Neisseria şi Branhamella cuprind, de regulă, saprofiţi nepatogeni ai mucoaselor bucofaringiene şi respiratorii superioare ale omului şi cresc relativ uşor pe medii uzuale („nepretenţioase"). Sînt două excepţii, de regulă, patogene şi pretenţioase în privinţa mediilor de cultură şi anume Neisseria meningitidis şi Neisseria gonorrhoeae, ultima dezvoltîndu-se mai ales pe mucoasele genitale.

Morfologic, cocii gramnegativi nu se deosebesc practic între ei, cu observaţia că neisseriile se dezvoltă de obicei sub formă de diplococi, în timp ce branhamelele (Micrococcus catarrhalis), se dezvoltă deseori sub formă de mase neregulate.

* Vezi şi nota de subsol de la cap. *3.2.1.3.*

3.2.1.2.1.1. Neisseria gonorrhoeae (gonococul) se prezintă sub forma unui diplococ gramnegativ, în boabe de cafea, cu partea turtită învecinată, uneori inegali ca dimensiuni. Este un parazit obligatoriu specific speciei umane, la care produce o uretrită acută purulentă (primoinfecții), la bărbat, și o cervicită (deseori asimptomatică), la femeie. Infecția se poate întinde în vecinătate, determinînd : prostatită, epididimită, salpingită, bartolinită, vulvovaginită (la fetițe), rectite. De asemenea, gonococul mai determină : faringite, perihepatită, septicemie, artrită, oftalmie la nou-născuți etc.

Evidențierea gonococilor se poate face prin frotiuri colorate cu Gram din secreții provenite din regiuni normal nepopulate cu neisserii (de ex., secreție uretrală), dar trebuie neapărat cultivat din regiunile cu o floră mixtă bogată și eventual populată cu alți coci gramnegativi (de ex., faringe și rect). Cultivarea gonococilor din produse patologice este dificilă, deoarece necesită medii bogate (geloză șocolată cu extras de drojdie sau mai bine mediul Thayer-Martin, eventual suplimentat cu 0,25 mg/ml de trimethoprim lactat, care inhibă creșterea proteului), sau alte medii mai sofisticate. Incubarea se face la 35°C, în atmosferă cu 3—5/100 CO_2 (borcan cu lumînare). Izolarea gonococilor și separarea lor de alte neisserii cade în sarcina laboratoarelor centrale sau de profil. Gonococii sînt de obicei sensibili la penicilină și tetraciclină.

3.2.1.2.1.2. Neisseria meningitidis (meningococul) poate fi un saprofit nepatogen al mucoasei faringiene, dar poate deveni patogen, invadînd torentul circulator și producînd o septicemie (des cu erupții hemoragice de tip embolic), uneori însoțite de un sindrom Waterhouse-Friderichsen. Se localizează apoi pe meninge, producînd o meningită acută purulentă. Meningococii sub formă de diplococi gramnegativi, deseori intracelulari, pot fi puși în evidență în frotiuri făcute din sedimentul de centrifugare al L.C.R. Colorați cu Gram și cu albastru de metilen (vezi fig. 62), uneori, meningococii sînt foarte rari sau autolizați și, din această cauză, trebuie cercetați cu perseverență. Ei pot fi cultivați pe medii bogate (Mueller-Hinton, geloză-sînge șocolată), unele produc colonii relativ mari, bombate. Folosind tehnici mai speciale (contraimunelectroforeză și coaglutinarea stafilococilor cu proteină A, încărcată cu anticorpi specifici, vezi *2.2.6.0.7. și 2.2.6.0.2.),* se poate pune în evidență în L.C.R. antigenul specific al meningococilor, chiar cînd nu se mai pot cultiva meningococi, la bolnavii care au și fost în prealabil tratați cu antibiotice. Aceste tehnici, care deocamdată nu sînt la îndemîna clinicianului, pot decela și antigenele specifice de pneumococ și de hemofil, în cazul meningitelor pricinuite de acești din urmă germeni. Neisseriile sînt de obicei sensibile la penicilină, ampicilină, cefotoxină, cefoxitină și cloramfenicol.

3.2.1.2.1.3. Branhamella catarrhalis și alte *neisserii nepretențioase* (6 specii cunoscute) se regăsesc pe frotiuri, izolați sau uneori în mase mari (vezi fig. 62). Ele cresc pe medii uzuale sărace. Nu prezintă interes dacă sînt izolate din nazofarinx. Excepțional, pot fi patogene, producînd meningite. Sînt de obicei sensibile la penicilina G (benzilpenicilină).

Scanned with OKEN Scanner

3.2.1.2.1.4. Cocii gramnegativi anaerobi (Veillonella) seamănă mult morfotinctorial cu cei aerobi, dar de obicei sînt mai mici. Ei sînt saprofiţi ai mucoaselor bucale, respiratorii superioare şi genitale. Pot fi rareori oportunişti, de obicei asociaţi cu alţi germeni anaerobi.

3.2.1.3. COCOBACILI GRAMNEGATIVI * (UNEORI BACTERIFORMI) ŞI BACILI SCURŢI GRAMNEGATIVI PLEOMORFI AEROBI

Germenii gramnegativi cocobacilari sau bacilari scurţi se pot prezenta izolaţi cîte doi sau în lanţuri scurte, uneori pleomorfi, în suveică, încapsulaţi şi cu coloraţie bipolară. Majoritatea sînt patogeni pentru animale (şi pentru om). Germenii aceştia sînt relativ pretenţioşi (facultativ aerobi, necesită pentru creştere o atmosferă cu CO_2, medii cu sînge, cu cisteină, sînge-glicerină-cartofi sau sînge-şocolată cu factor X sau V).

Din această categorie (fig. 63), fac parte germeni cuprinşi în următoarele genuri :

3.2.1.3.1. Pasteurella (Pasteurella multocida). Sînt germeni patogeni pentru animale (infecţii locale şi generale) şi mai rar pentru om, la care produc în special infecţii locale, după contact (uneori muşcături) de animale. Excepţional, mai pot provoca, la om : artrite, osteomielite, abcese hepatice şi cerebrale, septicemii, meningite etc. Pasteurelele sînt sensibile la penicilină.

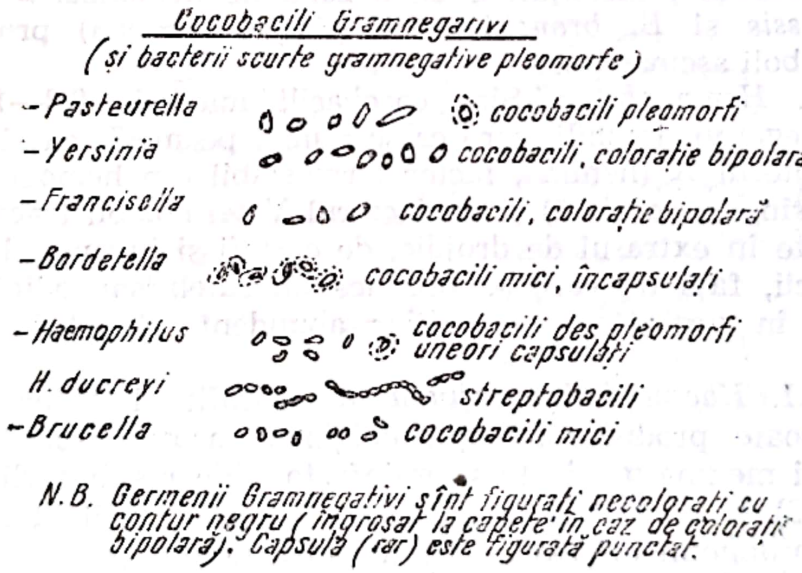


Fig. 63. — Cocobacili gramnegativi (capsula este figurată punctat ; conturul este îngroşat la capete, în caz de coloraţie bipolară).

* O serie de bacterii gramnegative se pot prezenta (mai ales în produse patologice) sub formă cocobacilară, greu de distins de cocii gramnegativi sau de cocobacilii gramnegativi. Din această cauză, morfologia germenilor trebuie controlată neapărat şi după cultivarea lor pe medii potrivite. Germenii mai des confundaţi cu cocii sau cu cocobacilii gramnegativi, din cauza dimensiunilor lor mici şi a formei lor, deseori pleomorfe, sînt *Acinetobacter*, denumiţi şi *Herella vaginalis* sau *Mima polymorpha*.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.1.3.2. Yersinia. Sînt cocobacili în suveică, deseori cu colorație bipolară, bine vizibilă cu coloraţia Giemsa, dar nu şi cu coloraţia Gram (actualmente au fost asimilate în Enterobacteriaceae). Pot produce la om infecţii torpide, benigne, dar şi unele infecţii mai acute, ca enterocolite, tulburări digestive diverse, adenite, abcese viscerale, peritonite şi foarte rar septicemii *(Yersinia enterocolitica).* De asemenea, pot produce adenite mezenterice şi, mai rar, diseminări viscerale *(Yersinia pseudotuberculosis).* Infecţii deosebit de grave sînt produse de *Yersinia pestis :* pesta bubonică, pulmonară şi septicemică. Manipularea Y. pestis în laborator este deosebit de periculoasă şi cere condiţii speciale de siguranţă şi protecţie (se execută numai în laboratoarele special echipate pentru aceasta).

3.2.1.3.3. Francisella. Rezervorul natural pentru *Francisella tularensis* este reprezentat de iepuri, şobolani şi alte rozătoare. Se poate transmite prin insecte hematofage, prin contagiune directă cutanată, pe cale digestivă şi chiar pe cale aerogenă. Produce la om tularemia şi, uneori, infecţii oculoganglionare. Sînt bacili scurţi, gramnegativi, cu coloraţie bipolară, *in vivo,* des încapsulaţi şi pleomorfi, ramificaţi şi chiar filamentoşi. Manipularea în laborator este periculoasă. Germenii sînt sensibili la streptomicină şi tetraciclină.

3.2.1.3.4. Bordetella. Sînt cocobacili mici de 0,3—1 μm ∅, imobili, des încapsulaţi, care pot prezenta coloraţie bipolară. Pe medii cu sînge-cartof-glicerol produc colonii mici (bine vizibile cu lupa), convexe, „în picătură de mercur", înconjurate de o zonă de hemoliză. *B. pertussis, B. parapertussis* şi *B. bronchiseptica* (singura mobilă) produc tusea convulsivă şi boli asemănătoare.

3.2.1.3.5. Haemophilus. Sînt cocobacili mici de 0,3—1,5 μm ∅, scurţi, gramnegativi, imobili, care cresc numai pe medii cu sînge, avînd nevoie de factorul X (hemina, factor termostabil din hemoglobină, care se obţine în sîngele şocolată) şi de factorul V termolabil (=coenzima I), care se găseşte în extrasul de drojdie, de cartofi şi în unele bacterii (de ex., stafilococii, faţă de care se produce un satelitism, adică hemofilii cresc numai în vecinătatea coloniilor abundente de stafilococi) (vezi fig. 63).

3.2.1.3.5.1. Haemophylus influenzae, saprofit al căilor respiratorii superioare, poate produce la copii epiglotite acute, bronhopneumonii, endocardite şi meningite. Poate suprainfecta căile respiratorii în infecţia gripală (virală) şi poate produce puseuri acute pe căile respiratorii la bolnavii cu bronhopneumopatie cronică obstructivă.

3.2.1.3.5.2. H. parainfluenzae, H. haemolyticus şi *H. parahaemolyticus* sînt saprofiţi, rar oportunişti ai căilor respiratorii superioare. Ultimii doi produc în jurul coloniilor o zonă de β-hemoliză.

3.2.1.3.5.3. Haemophilus ducreyi se prezintă sub forma unor cocobacili scurţi, gramnegativi, des în lanţuri (vezi fig. 63). Produce „şancru moale", cu ulceraţii la poarta de intrare şi adenită supurată. Este sensibil la sulfamide.

3.2.1.3.5.4. H. aphrophilus şi *H. vaginalis* (Corynebacterium vaginalis) sînt, de obicei, saprofiţi ai mucoasei genitale la femei, rareori, oportunişti.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.1.3.6. Brucella. Sînt cocobacili imobili, gramnegativi, deseori cu coloraţia bipolară, uneori încapsulaţi, patogeni pentru animal şi om. Se dezvoltă *in vivo* intracelular şi pot invada diferite ţesuturi : ganglioni limfatici, măduva osoasă şi diverse ţesuturi şi organe (oase, articulaţii, uter, plămîn, endocard, sistem nervos etc.). În cultura primară, cresc foarte încet (3 săptămîni), în atmosferă cu CO_2 5—10/100.

Brucella melitensis produce febra ondulată de Malta ; *Brucella abortus* produce avortul epidemic la vaci şi boala Bang ; *Brucella suis* şi *Brucella canis* pot produce (mai rar la noi în ţară) infecţii la om.

3.2.1.4. BACILI GRAMNEGATIVI AEROBI

Bacilii gramnegativi fac parte din multe familii, genuri, specii şi tipuri, care nu pot fi distinse prin caracterele lor morfotinctoriale (fig. 64). Pentru clasificarea lor, trebuie să se recurgă la medii speciale, la caractere fermentative (biochimice), la tipizări serologice, bacteriologice etc. Numărul lor depăşeşte 2000 şi descrierea lor chiar sumară, depăşeşte cadrul prezentei lucrări cu totul elementară. Recomandăm călduros consultarea manualelor de microbiologie, care sînt indispensabile în bibliotecile tehnice şi care nu trebuie să lipsească din laboratoare.

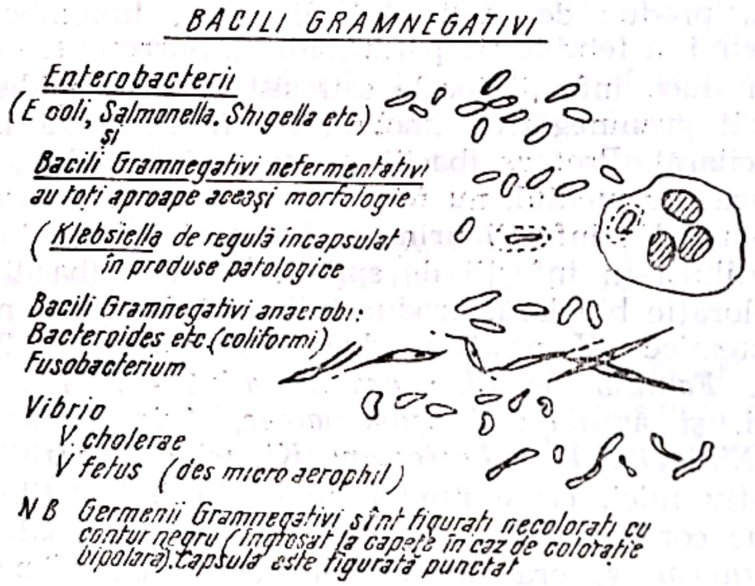


Fig. 64. — Bacili gramnegativi.

Identificarea tuturor bacililor gramnegativi nu este posibilă decît în laboratoare centrale de spital, de C.S.A. sau de profil sau chiar numai în centre de referinţă.

Clasificarea bacililor gramnegativi suferă în decursul anilor o serie de îmbunătăţiri şi rearanjări de interes ştiinţific, bacteriologic şi epidemiologic.

O serie de germeni, care înainte erau consideraţi saprofiţi inocenţi, s-au dovedit în ultimul timp (mai ales în condiţiile actuale : selecţie prin

Scanned with OKEN Scanner

antibiotice, dezechilibre ecologice, tulburări și deficiențe organice și de imunitate naturală sau medicamentoasă) potențial patogeni, putînd produce diferite infecții locale sau sistemice, care pot îmbrăca în unele colectivități sanitare un caracter epidemic.

Redăm în mod orientativ o clasificare foarte rezumativă și, în bună parte, depășită a bacililor gramnegativi, folosind drept criteriu principal caracterul lor morfotinctorial. În marea lor majoritate, sînt saprofiți, condiționat patogeni ai tractului digestiv, ai căilor respiratorii superioare și ai organelor urogenitale (în special la femeie). Majoritatea lor sînt comuni animalelor mamifere și omului.

3.2.1.4.1. Familia Enterobacteriaceae are 12 genuri (fiecare cu numeroase specii, subspecii și tipuri) și anume, în ordine alfabetică : *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia* (cu E. coli, bacil gramnegativ, mobil, fermentează lactoza, saprofit normal al tubului digestiv, implicat foarte des în infecții urinare, uneori în tulburări digestive ; unele tulpini produc o enterotoxină de tipul celei produse de vibrionul holeric ; poate produce infecții locale și sistemice), *Erdwardsiella, Erwinia, Hafnia, Klebsiella* (bacili gramnegativi, înconjurați de o capsulă în produsele patologice — vezi fig. 64 —, fermentează lactoza, produc colonii mari, mucoide, des saprofiți în căile respiratorii și în tractusul digestiv ; produc pneumonii severe, septicemii, meningite, peritonite, pot produce epidemii de spital), *Salmonella* (bacili gramnegativi, mobili, nu fermentează lactoza, produc des tulburări digestive, toxiinfecții alimentare, uneori septicemii și febrele tifoparatifoidice), *Serratia* (de obicei saprofit, poate însă produce infecții locale sau sistemice și epidemii de spital), *Shigella* (bacili gramnegativi, imobili, nu fermentează lactoza, produc dizenteria bacilară), *Proteus* (bacili gramnegativi, mobili, produc colonii largi, invadează des mediul, nu fermentează lactoza ; saprofiți ai tubului digestiv ; produc des infecții urinare și uneori infecții locale sau sistemice ; des întîlniți în infecții de spital), *Yersinia* (bacili gramnegativi, deseori cu colorație bipolară, produc tulburări digestive, mai rar infecții locale sau sistemice ; Y. pestis produce pesta ; vezi și 3.2.1.3.2.).

3.2.1.4.2. Familia bacililor gramnegativi aerobi „nefermentativi" are 9 genuri, și anume : *Achromobacter, Acinetobacter, Alcaligenes, Comamonas, Eikinella, Flavobacterium, Kingella, Moraxella* (bacili gramnegativi, relativ mici, cresc numai pe medii îmbogățite cu sînge sau cu ser, produc conjuctivite ; o specie. *M. osloensis* poate fi confundată cu *N. gonorrhoeae* și era uneori confundată cu *Mima polymorpha), Pseudomonas* (bacili gramnegativi, izolați sau în perechi sau lanțuri scurte ; *P. aeruginosa* produce des un pigment albastru-verde și are un miros caracteristic ; produce infecții urinare locale și sistemice și deseori epidemii de spital ; *P. maltophila* poate de asemenea produce infecții de spital, *P. mallei*, denumit înainte Actinobacillus mallei, produce *morva ; P. pseudomallei* produce melioidoza).

3.2.1.4.3. Familia Vibrionaceae, bacili încurbați și cu un cil terminal, are 2 genuri : *Vibrio (V. cholerae* produce holera ; *V. parahaemolyticus* produce diaree acută sau toxiinfecții alimentare ; și alte genuri nepatogene, eventual saprofite) și *Aeromonas*. La aceștia, se adaugă din cauza aspectului lor morfologic și *vibrionii anaerobi*.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.1.5. BACILI GRAMNEGATIVI ANAEROBI

Sînt bacili strict anaerobi, care nu fac spori.

3.2.1.5.1. Genul Bacteroides cuprinde bacili asemănători colibacilului, dar de obicei mai subțiri, care reprezintă aproape totalitatea florei intestinale. Pot produce infecții locale, locoregionale abdominale și în sfera genitală la femeie, mai rar septicemii și abcese la distanță în plămîn, creier etc. Degajă un miros fecal „de colon", atribuit înainte pe nedrept colibacililor. Sînt întotdeauna insensibili la antibiotice aminoglicozidice, dar sînt sensibili la : cloramfenicol, metronidazol, tetraciclină și (des) clindamicină.

3.2.1.5.2. Genul Fusobacterium cuprinde bacili lungi, subțiri, cu capetele ascuțite, des colorați neuniform și pleomorfi. În unele infecții, se asociază cu spirili gramnegativi, producînd angine, gingivite, rareori traheobronșite „fuzospirilare".

3.2.1.6. BACILI SAU ALȚI GERMENI PLEOMORFI GRAMNEGATIVI GREU CLASIFICABILI

Citățm : *Actinobacillus, Agrobacterium, Calymmatobacterium, Cardiobacterium, Chromobacterium, Legionella pneumophila* (agent al pneumoniei legionarilor), *Streptobacillus moniliformis* (unul din agenții care pot produce boala mușcăturilor de șobolan sau sodoku). Toți acești germeni sînt bacili sau streptobacili gramnegativi, foarte pleomorfi, care se colorează adesea mai bine cu Giemsa decît cu Gram, sînt saprofiți ai căilor respiratorii și digestive, dar pot rareori produce infecții grave la om.

La toți aceștia, se pot adăuga germenii gramnegativi, de obicei cocobacilari mai sus descriși : *Pasteurella, Bordetella, Haemophilus, Brucella* (vezi și 3.2.1.3.).

Deși identificarea bacililor gramnegativi pe criterii morfologice, tinctoriale și culturale pe medii uzuale nu este posibilă, totuși, în contextul epidemiologic și clinic, se pot bănui deseori anumite infecții și chiar se poate începe un tratament rațional.

★

Regulă de bază : toți bacilii gramnegativi, ca și alți germeni care ar putea fi implicați în izbucniri epidemice, acei care ar putea fi încadrați, eventual, în boli de declarare obligatorie prin lege, precum și acei care sînt responsabili de boli grave (bronhopulmonare, digestive, urogenitale, endocardite, abcese cerebrale, meningite, septicemii etc.) trebuie întotdeauna identificați în laboratoare calificate corespunzător și, mai ales și cu precădere, trebuie determinată sensibilitatea lor la antibiotice și chimioterapice, prin metoda difuzimetrică și eventual și prin metoda diluțiilor pentru determinarea de CMI și CMB.

Scanned with OKEN Scanner

De notat că majoritatea actuală a germenilor rezistenţi la antibioticele uzuale (mai ales în unităţile sanitare) fac parte din genurile : Pseudomonas, Klebsiella, Serratia, mai rar Proteus, Providencia, Staphylococcus şi altele.

3.2.1.7. BACILI GRAMPOZITIVI AEROBI ŞI ANAEROBI

Bacilii grampozitivi pot fi împărţiţi clasic în 4 grupe şi anume :

— *bacili aerobi* (sau anaerobi facultativi), *grampozitivi* (sau facultativ grampozitivi), *sporulaţi*, tip bacteridia carbonoasă (Bacillus anthracis) ;

— *bacili aerobi* (sau facultativ anerobi sau microaerofili), *grampozitivi* (dar pot pierde uşor coloraţia Grama), *nesporulaţi*, pleomorfi, care prezintă des granule diferite colorate (tip Corynebacterium diphteriae) ;

— *bacili anaerobi*, grampozitivi, nesporulaţi (tip Propionibacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Actinomyces etc.) ;

— *bacili anaerobi grampozitivi sporulaţi* (tip Clostridium).

Criteriile folosite nu sînt, însă, pentru clinicianul „microscopist amator" nici întotdeauna caracteristice şi nici întotdeauna uşor de decelat.

Caracterul de grampozitiv nu este întotdeauna observat, deoarece o serie de bacili se decolorează uşor şi pot să apară gramnegativi, mai ales în produse patologice (în special, dacă au un pH acid). Mai departe, o serie de germeni „sporulaţi" nu apar în produsele patologice cu spori (de ex., Bacillus anthracis nu sporulează în organism, dar sporulează numai în contact cu aerul). În sfîrşit, caracterul de anaerob nu poate fi pus în evidenţă decît prin caractere culturale : germenii anaerobi nu cresc decît în anaerobioză, spre deosebire de mulţi alţi germeni aerobi, care sînt şi anaerobi facultativi.

Ca indicaţie cu totul orientativă, semnalăm că bacilii grampozitivi „sporulaţi" sînt, de obicei, mai mari şi mai groşi decît cei nesporulaţi şi că, în produsele patologice (şi pe medii de cultură bogate), apar deseori încapsulaţi. Germenii care apar în produsele patologice cu spori sînt de obicei anaerobi. Bacilii anaerobi se izolează, de obicei din produse patologice pluriinfectate (de ex., coci şi bacili), fetide şi cu o floră foarte abundentă (cu foarte mulţi germeni vizibili pe fiecare cîmp microscopic). Există o discrepanţă evidentă între abundenţa germenilor observaţi la microscop şi sărăcia sau absenţa coloniilor crescute pe medii aerobe.

3.2.1.7.1. Bacili grampozitivi sporulaţi aerobi. Aceşti bacili sînt germeni foarte răspîndiţi în natură, majoritatea din genul *Bacillus*, uneori saprofiţi ai omului, rareori patogeni, cu excepţia *B. anthracis* (bacteridia cărbunoasă), care este foarte patogenă şi care produce la animal şi la om cărbunele, cu diverse forme clinice.

3.2.1.7.1.1. Bacillus anthracis este o bacterie mare de 4—8 pe 1—1,5 μm, cu capetele tăiate drept, izolată sau în lanţuri, care în produsele patologice apare deseori înconjurată de o capsulă. Uneori, la bolnavii cu anticorpi specifici (seroterapie) sau trataţi cu antibiotice,

Scanned with OKEN Scanner

bacilii îşi pierd coloraţia Gram, în mod neregulat, putînd simula uneori un lanţ scurt de streptococi (fig. 65).

În septicemiile carbonoase, hemoculturile pot fi pozitive, fără să se observe o tulburare evidentă a mediului. La examenul atent şi dacă

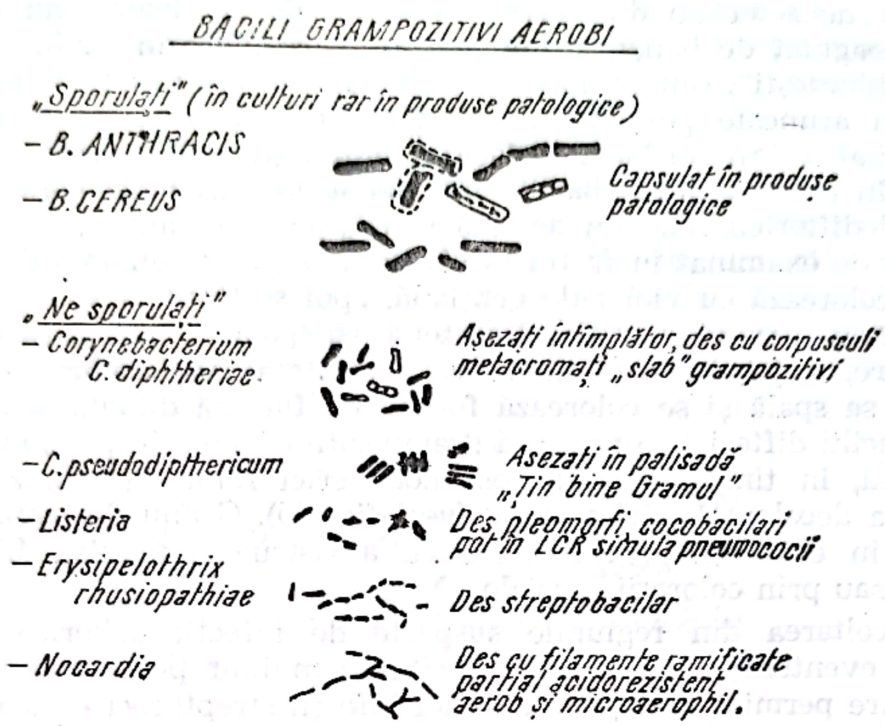


Fig. 65. — Bacili grampozitivi aerobi.

se roteşte uşor balonul de hemocultură, se observă uneori un fel de „ape", care indică pozitivarea hemoculturii. Bacillus anthracis, fiind foarte patogen, trebuie manipulat în laborator cu mare grijă.

3.2.1.7.1.2. Alte specii din genul Bacillus (B. cereus, B. circulans, B. pumilis, B. sphericus, B. subtilis etc.) pot fi izolate de la om, fără a fi patogene. Ei pot însă contamina produsele patologice şi mediile de cultură. Diferenţierea lor este uneori dificilă şi cade în sarcina microbiologilor. Rareori, pot produce toxiinfecţii alimentare şi infecţii grave, ca : pneumonie, meningite, septicemii etc.

3.2.1.7.2. Bacili grampozitivi nesporulaţi aerobi. Aceşti bacili au un oarecare grad de pleomorfism, deseori cu o colorabilitate inegală, eventual au granule metacromatice, sînt imobili şi nu fac spori.

3.2.1.7.2.1. Corynebacterium diphteriae. Face parte din genul *Corynebacterium*, care cuprinde bacili uneori uşor încurbaţi, cu capete rotunde, eventual puţin umflate. Germenii nu se colorează uniform şi pot prezenta granule metacromatice multiple (în special C. diphteriae) sau doar polare (C. xerozis) sau deloc (C. pseudodiphtericum) (vezi fig. 65).

Corynebacterium diphteriae produce difteria. Patogenitatea este în raport direct cu toxigeneza bacililor, nu cu tipul (gravis, mitis, intermedius), cum se credea înainte. Deosebirile morfotinctoriale între diferitele specii de Corynebacterium (C. diphteriae, C. pseudodiphtericum,

Scanned with OKEN Scanner

C. xerozis) sînt mici. Ultimii (denumiți și pseudodifterici) sînt uneori saprofiți inocenți ai faringelui, dar pot fi și oportuniști, putînd produce : endocardite, meningite, empieme, pneumonii, abcese cerebrale, osteomielite etc.

Corynebacterium diphteriae, în produsele patologice sau în culturi pe ser coagulat de bou, prezintă așezări neregulate în *V, L, Y,* (sau în „litere chinezești", sau se mai compară cu așezarea întîmplătoare a unor chibrituri aruncate pe o masă). Prezintă deseori mai multe granulații metacromatice într-un bacil și dacă se prelungește decolorarea cu alcool-acetonă în tehnica Gram, bacilii difterici se lasă ușor decolorați, în timp ce pseudodifthericii nu. Din această cauză, se recomandă să se facă din produsul de examinat în frotiu întins pe lamă, pe o lungime de 3—4 cm, care se colorează cu violet de gențiană, apoi se tratează cu lugol și apoi se decolorează repede cu alcool-acetonă, se spală cu apă și se usucă ; în continuare, o jumătate de lamă va fi tratată mai prelung cu alcool-acetonă, se spală și se colorează fondul cu fucsină diluată sau cu rodamină. Bacilii difterici se prezintă grampozitivi numai în porțiunea repede decolorată, în timp ce bacilii pseudodifterici rămîn grampozitivi și în porțiunea decolorată mai prelung (vezi fig. 45). Granulele metacromatice se pun în evidență prin colorare cu albastru de metilen Löffler sau boraxat sau prin colorații speciale.

Recoltarea din regiunile suspecte de infecții difterice (nas, gît, laringe, eventual alte regiuni), se face simultan pe 3 medii : *geloză-sînge,* care permite și depistarea unei infecții streptococice ; *ser coagulat de bou* (mediu Löffler), pe care bacilii difterici sînt mai caracteristici ; un *mediu diferențial cu telurit.* Criteriul cel mai important în identificarea bacilului difteric este toxigeneza, ușor de studiat *in vitro* prin tehnica Elek, care se execută de obicei în laboratorul central de microbiologie clinică sau în laboratorul C.S.A.

3.2.1.7.2.2. Listeria monocytogenes și alte specii fac parte din genul *Listeria,* care cuprinde bacili mici, nesporulați, neîncapsulați, grampozitivi, destul de mult răspîndiți în natură, în special la ierbivore și rozătoare. La om, poate produce : angine, meningite, meningoencefalite, endocardite, abcese, peritonite, infecții cutanate și oculoganglionare. Poate fi implicat în avorturi la animale și la femei și în infecții diverse, uneori fatale, la nou-născuți. Pe medii cu sînge, produce colonii mici, care se înconjură încet cu o β-hemoliză. Listeriile cresc bine la 25° și chiar la 4°C.

3.2.1.7.2.3. Erysipelothrix rhusiopathiae este agent al rujetului la porci. Este un bacil grampozitiv, imobil, necapsulat, nesporulat, care crește des în filamente lungi streptobacilare. La om, poate produce infecții localizate (erizipeloid), cu evoluție de obicei relativ înceată. Poate interesa articulațiile, putînd să determine : bacteriemii, endocardită și septicemii, cu diferite localizări secundare.

3.2.1.7.2.4. Nocardia asteroides, Nocardia brasiliensis și alte specii fac parte din genul *Nocardia.* Uneori, sînt saprofiți și alteori patogeni pentru animale și om, producînd : procese infecțioase și supurative cronice ale părților moi (mycetoame), infecții pulmonare, ganglionare,

abcese cerebrale și meningite. *Nocardia asteroides* este în parte alcoolo-acidorezistent, microaerofil și crește mai bine în atmosferă cu CO_2. Se prezintă sub forme cocobacilare, bacilare sau filamentoase, uneori ramificate, este grampozitiv și cu unele porțiuni acidoalcoolorezistente (vezi fig. 65). Crește încet pe medii de cultură. Poate fi izolat din spută și pe medii de cultură executate pentru depistarea unei infecții tuberculoase. Poate fi confundat cu unele specii de Streptomyces. Diferențierea și identificarea cad în sarcina laboratoarelor profilate.

3.2.1.7.3. Bacili grampozitivi sporulați anaerobi. Genul *Clostridium* este compus din multe specii de bacili grampozitivi, anaerobi (uneori microaerofili), care formează spori rotunzi sau ovalari, terminali, subterminali sau centrali. La nivelul sporului, bacteria este umflată, în chip de măciucă sau în rachetă de tenis sau în formă de fus (fig. 66). În colorația cu Gram sau cu albastru de metilen, sporii apar incolori și refringenți (pot fi colorați cu tehnici speciale).

Fig. 66. — Bacili grampozitivi anaerobi sporulați.

Clostridiile sînt foarte răspîndite în natură, în sol, în apă, în intestinul animalelor și al omului, în tractul genital la femeie. Pot produce izolat, dar mai des asociați (cu coci și/sau bacili aerobi și anaerobi) abcese, infecții locale și diferite tablouri clinice : *gangrena gazoasă* (Clostridium perfringens, C. novyi, C. septicum, C. histolyticum etc.), *tetanosul* (Clostridium tetani), *botulismul* (Clostridium botulinum, tip A, B, C, D, E, F, G.), *infecții locale, tulburări digestive, abcese, peritonite bacteriene* etc. (C. perfringens, C. ramosum, C. spheroides, C. sporogenes etc.), *tulburări digestive postantibiotice* (C. difficile).

În produsele patologice, clostridiile apar în general sporulați : *C. tetani*, cu spori rotunzi terminali ; *C. botulinum, C. histolitycum, C. novyi, C. septicum, C. sporogenes* etc., cu spori ovali subterminali. *C. perfringens*, în produsele patologice, apare des capsulat. Pentru izolarea și cultivarea clostridiilor, dintr-un produs patologic, unde sînt germeni sporulați, se încălzește produsul 10 minute la 80°C și apoi se inoculează imediat pe medii prereduse pentru anaerobi. Pentru înlăturarea germenilor aerobi (Proteus, Pseudomonas etc.), care se pot găsi în mari cantități în produsul patologic, se folosesc medii cu neomicină, care inhibă aerobii, dar nu și anaerobii. Clostridiile mai des întîlnite sînt *C. perfringens* și *C. ramosum.*

Clostridiile sînt, în general, sensibile la : penicilină, cloramfenicol, metronidazol. *C. ramosum* este în general mai rezistent la penicilină decît celelalte clostridii.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.1.7.4. Bacili grampozitivi nesporulaţi anaerobi :

3.2.1.7.4.1. Bifidobacterium sînt bacili grampozitivi, difteromorfi sau filamentoşi, care fac parte din flora normală orală şi intestinală. Pot fi izolaţi din infecţii pulmonare mixte.

3.2.1.7.4.2. Propionibacterium sînt bacili gramnegativi, dar uşor încurbaţi. Fac parte din flora normală a pielii *(P. acnes)*. Deseori, pot contamina hemoculturile. Rareori, pot produce infecţii de cateter, de proteze valvulare, de şunturi ventriculare, după tratamentul chirurgical al hidrocefaliei. Sînt sensibili la penicilină şi la alte antibiotice, cu excepţia aminoglicozidelor.

3.2.1.7.4.3. Eubacterium se izolează des din răni, asociat cu alţi germeni şi face parte din flora intestinală normală. Sînt bacili grampozitivi pleomorfi, uneori cocobacilari, în perechi sau în lanţuri scurte.

3.2.1.7.4.4. Lactobacillus sînt bacili grampozitivi, deseori aşezaţi în palisade (fig. 67). Există mai multe specii, saprofiţi ai mucoaselor *(L. döderlein*, oaspete normal al mucoasei vaginale, produce acid lactic prin fermentarea glucozei). Rareori, au fost izolaţi din infecţii pleuropulmonare.

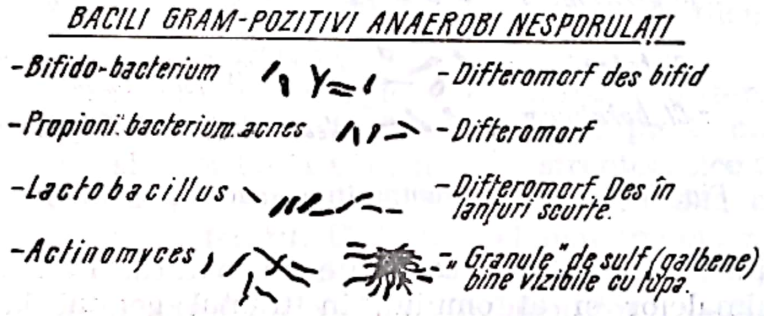


Fig. 67. — Bacili grampozitivi anaerobi nesporulaţi.

3.2.1.7.4.5. Actinomyces israelii şi alte specii din genul Actinomyces sînt agenţii actinomicozei umane. Sînt bacili grampozitivi difteroizi, cocobacilari sau filamentoşi, uneori ramificaţi, care sînt deseori saprofiţi ai cavităţii bucale. Pot produce infecţii locale subacute sau cronice, cu abcese fistulizate, în al căror puroi se pot evidenţia granule galbene (ca sulful), compuse din culturi de germeni. Granulele pot fi observate cu ochiul liber sau cu lupa, iar la microscop, după colorare cu albastru de metil, cu Gram sau cu Ziehl. Actinomycetele sînt sensibile la : penicilină, sulfamide, tetraciclină (şi la tratament cu iod).

3.2.1.8. MICOBACTERIILE

Sînt bacili acido-alcoolo-rezistenţi. Se colorează în roşu cu tehnica Ziehl.

Sînt numeroase specii, din care 3 sînt implicate de regulă în *tuberculoza umană : Mycobacterium tuberculosis, M. bovis*, şi *M. kansasii*.

Alte 8 specii pot produce, uneori, infecţii de obicei mai benigne la om şi alte 8 sînt saprofiţi nepatogeni ai omului.

Scanned with OKEN Scanner

La acestea, se adaugă *Mycobacterium leprae*, necultivabil pe medii de cultură, care produce lepra.

Micobacteriile sînt bacili, uneori scurți, alteori mai lungi (0,8—5 μm) și relativ subțiri (0,2—0,5 μm), drepți sau ușor încurbați, adesea colorați inegal, granulari. De obicei, apar așezați în grupe de mai multe bacterii paralele (fig. 68) sau sub formă de funii (mai ales în medii de cultură lichide) sau în grupe dense intracelulare (globi leproși).

Fig. 68. — Bacili acido-alcoolo-rezistenți.

Avînd în vedere posibilitatea de infectare a examinatorului cu bacili tuberculoși și posibilitatea unor rezultate fals pozitive cu bacili acido-alcoolo-rezistenți rămași pe lamele portobiect sau aderați pe uleiul de cedru de pe imersie sau proveniți de la robinetul de apă caldă etc., examinarea micobacteriilor implică anumite reguli de siguranță, și anume : examinatorul, de preferință, va fi o persoană în vîrstă de peste 30 de ani, cu o intradermoreacție la P.P.D. pozitivă, care va lua întotdeauna măsuri de protecție pentru el și pentru masa de lucru (de preferință, sputele se lucrează în nișă sau cel puțin după un geam de protecție, fixat la cca 45° de marginea mesei de lucru între fața operatorului și materialul de prelucrat). Tuburile de centrifugă vor avea, de preferință, capace înșurubate în mod etanș. Lamele portobiect, pe care s-au găsit bacili acido-alcoolo-rezistenți, se îndepărtează și nu vor mai fi reutilizate pentru asemenea cercetări. De asemenea, dacă s-au observat într-un preparat microscopic bacili acido-alcoolo-rezistenți, trebuie să se șteargă cu grijă uleiul de cedru de pe obiectul de imersie, pentru a îndepărta eventualii bacili, care ar putea să adere acolo.

Avînd în vedere multitudinea felurilor de micobacterii, pentru punerea corectă a unui diagnostic de tuberculoză, simpla bacterioscopie nu este suficientă. În practică, însă, însumarea unor argumente epidemiologice, clinice și radiologice, împreună cu decelarea de bacili acido-alcoolo-rezistenți dintr-un produs, care de obicei (sau niciodată) nu adăpostește asemenea germeni (de ex., sputa unui bolnav cu leziuni radiologice sugestive de tuberculoză ; L.C.R., de la un bolnav cu meningită) asigură practic diagnosticul de tuberculoză.

Pentru baciloscopie, se folosesc lame portobiect noi, perfect curate, pe care se întinde cu ansa de platină sau se disociază cu ansa și acul, sau se strivește între două lame portobiect o mică porțiune mai reprezentativă din materialul patologic. Pentru baciloscopie (dar nu și pentru culturi), se poate supune materialul patologic la o decontaminare, omo-

Scanned with OKEN Scanner

genizare și concentrare a germenilor prin centrifugare sau flotație. Aceste tehnici mai laborioase și mai pretențioase cad în competența medicilor de laborator, profilați pe aceste probleme.

Baciloscopia se face la microscop, cu obiectivul de imersie, după colorarea preparatului cu tehnica Ziehl-Neelsen (vezi *1.3.7.0.2.3.* și *Anexa 2).*

Tehnica colorării cu fluorocrom (auramină sau rodamină și examinarea în lumină ultravioletă) prezintă avantaje, dar nu este la îndemîna micilor laboratoare.

Prin baciloscopie, nu se poate decela de obicei decît dacă numărul bacteriilor este mai mare de 10^4—10^5 germeni/ml și, din această cauză, se impune executarea de culturi, care pot decela 10—100 germeni/ml. În plus, culturile sînt necesare pentru identificarea micobacteriilor și pentru determinarea sensibilității germenilor la tuberculostatice. Fără a intra în detalii, care privesc medicii de laborator profilați pe aceste probleme, amintim doar că bacilii acidoalcoolorezistenți care cresc în 3—5 zile sînt nepatogeni și că determinarea sensibilității bacilului tuberculos la tuberculostatice are o însemnătate statistică și de orientare a politicii de tratament în masă, mai degrabă decît pentru tratamentul fiecărui caz în parte.

Pentru baciloscopie se utilizează tehnica Ziehl-Neelsen (vezi *1.3.7.0.2.3.* și *Anexa 2).* Examinarea se face cu răbdare, explorînd de 3 ori suprafața frotiului de la dreapta la stînga, de la stînga la dreapta și încă o dată de la dreapta la stînga, parcurgînd de fiecare dată o altă arie. Se recomandă să se facă o apreciere semicantitativă.

Dacă se observă doar 1—2 germeni tipici pe toată lama, se va repeta examenul pe un nou preparat. Se pot raporta „rari" bacili între 3—10 pe lamă ; „puțini" peste 10 pe lamă și „mulți" peste unul pe cîmp microscopic, sau se vor folosi mai bine criteriile indicate de către Institutul de ftiziologie.

Culturile directe din L.C.R. sau din sedimentul de centrifugare se pot face fără altă preparare pe mediu Löwenstein-Jensen.

Pentru culturi din spută, din urină sau din alt produs plurimicrobian, trebuie procedat la o decontaminare și la diferite tehnici, care cad în sarcina laboratorului central sau profilat pe aceste probleme. Este de preferat ca examinarea să se facă pe mai multe probe proaspete, decît pe recoltarea unui volum mai mare de produs patologic adunat pe 24 de ore.

3.2.1.9. SPIRILI ȘI SPIROCHETE

3.2.1.9.1. Campylobacter. Sînt germeni rigizi, încurbați, mobili, avînd un flagel la extremități ; cresc numai în condiții de microaerofilie (nu în aerobioză, nici în anaerobioză). *Campylobacter foetus* (Vibrio foetus) și unele subspecii pot fi izolați din intestinul oamenilor normali ; pot însă produce și infecții torpide sau chiar fulminante cu

Scanned with OKEN Scanner

febră, tromboflebite, tulburări digestive dizenteriforme, endocardite, artrite, meningoencefalite. Pot produce avort, la femeile însărcinate.

3.2.1.9.2. Spirillum minor (minus) este agentul patogen în boala muşcăturii de şobolan (sodoku), cu incubaţie lungă. Se colorează bine numai cu Giemsa.

3.2.1.9.3. Borrelia. Sînt paraziţi la diverse artropode, în special căpuşe şi păduchi. Se prezintă sub forma unor filamente de 10—20 μm cu 5—7 spirale largi. Se colorează cu Giemsa, iar *Borrelia recurrentis,* chiar cu violet de genţiană sau cu fucsină simplă. În sîngele periferic, pe frotiu sau în picătură groasă, la începutul acceselor, au o formă mai rigidă, apoi prezintă flexiuni mari sinuoase, se aglutinează în grămezi de mai mulţi indivizi (vezi fig. 69), apoi dispar din sîngele periferic între accese. *Borrelia recurrentis* produce febra recurentă de păduchi. Diagnosticul microscopic este uşor, la îndemîna oricărui microscopist.

Fig. 69. — Spirili şi spirochete.

3.2.1.9.4. Treponema. Există multe specii nepatogene, care se pot izola din cavitatea bucală, din tractul digestiv şi genital. Patogene pentru om sînt : *Treponema pallidum,* agent al sifilisului ; *T. pertenue,* agentul framboesiei sau yaws ; *T. carateum,* agent al pintei. Sînt anaerobi obligatoriu. Se pot colora greu cu Giemsa prelungit. Se pot pune în evidenţă în preparaţie argentică, cu anticorpi fluorescenţi, dar cel mai simplu pot fi puşi în evidenţă prin microscopie, în cîmp întunecat, cînd apar sub formă de organisme spirilate, cu numeroase spire dese şi rigide de 5—20 μm lungime şi 0,2 μm grosime (vezi fig. 69). Diagnosticul microbiologic al sifilisului cade în sarcina laboratoarelor de profil.

3.2.1.9.5. Leptospira. Sînt organisme foarte subţiri, lungi de 10—15 μm spirilaţi, avînd la un capăt o umflătură („în gămălie de ac") şi la extremitatea opusă o încurbare în formă de cîrlig (fig. 69). Sînt numeroase specii de leptospire : *Leptospira icterohaemorrhagiae, L. canicola, L. pomona* şi altele. Sînt răspîndite în natură la animale, în special la rozătoare. La om, produc leptospirozele. Leptospirezele pot fi puse foarte greu în evidenţă în sînge, la începutul bolii, şi apoi în urină, prin examenul microscopic în cîmp întunecat. Diagnosticul de laborator al leptospirozelor cade în sarcina medicilor de laborator clinic profilaţi pe problemă.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.1.10. AGENȚI MICROBIENI DEFECTIVI, OBLIGATORIU INTRACELULARI, MICI (chiar la limita vizibilității cu microscopul optic)

3.2.1.10.1. Forme L. În această categorie, intră o serie de forme *L* ale unor bacterii (sferoplaști și protoplaști), care nu pot decît fi bănuiți pe baza aspectului lor microscopic.

3.2.1.10.2. Mycoplasma cuprinde agenții denumiți altădată „PPLO" (pleuropneumonia like organisms). Dintre speciile de micoplasme, singură *Mycoplasma pneumoniae* este sigur patogenă pentru om, producînd o pneumonie primară atipică. Germenul este pleomorf, colorabil bine cu Giemsa, dar de nerecunoscut de obicei în produse patologice. Pe medii speciale, în condiții de incubare cu CO_2, cresc colonii caracteristice. Identificarea lor cade în sarcina medicilor de laborator specializați.

3.2.1.10.3. Chlamydia. Sînt paraziți imobili, gramnegativi, colorabili mai bine cu Giemsa sau cu Machiavelo. Sînt obligatoriu intracelulari, unde pot produce microcolonii (incluzii). Sînt mai multe specii de chlamidii, care produc ornitoza-psittacoza, limfogranulomatoza venerianã, trahomul și diverse alte sindroame, printre care și o uretrită zisă „nespecifică".

3.2.1.10.4. Rickettsia. Sînt, de asemenea, agenți obligatoriu intracelulari, mici, colorabili cu Giemsa sau cu alte colorații speciale.

★

Diagnosticul infecțiilor cu micoplasme, chlamidii, rickettsii *nu* se poate pune prin punerea lor în evidență directă din produsul patologic. Diagnosticul se pune pe criterii epidemiologice, clinice, reacții serologice, culturi și inoculări, care cad în sarcina medicilor de laborator specializați. Semnalăm doar faptul că, în unele rickettsioze (de ex., în tifosul exantematic), se poate recurge la un diagnostic serologic prezumtiv, prin aglutinarea de către serul bolnavului a unor specii de proteu (Proteus OX19).

3.2.2. VIRUSURI ȘI VIROZE

Virusurile sînt agenți de dimensiuni mici, submicroscopici, paraziți intracelulari obligatoriu, vizibili la microscopul elctronooptic, al căror număr este de ordinul sutelor.

Clasificarea virusurilor este încă în continuă schimbare și ameliorare, deoarece nu s-a ajuns încă la norme uniforme de încadrare. Se folosește cînd localizarea obișnuită la om (de ex., rinovirusuri, enterovirusuri etc.), cînd aspectul clinic (de ex., poxvirusuri), cînd aspectul la microscopul electronic (de ex., „rotavirusuri"), cînd felul acidului nucleic (ADN- sau ARN-virusuri) și numărul și aranjarea capsomerilor, sau denumiri mai mult sau mai puțin fanteziste, ca ECHO-virusuri sau combinate din mai multe criterii ca picornavirusuri etc.

Scanned with OKEN Scanner

Diagnosticul virozelor se face pe baza criteriilor epidemiologice, clinice şi pe rezultatele laboratoarelor cu profil de virusologie clinică.

Am semnalat unele aspecte şi analize elementare la îndemîna clinicianului, care pot constitui criterii prezumtive pentru diagnosticul de gripă (rinocitodiagnostic, vezi *2.5.*), de mononucleoză infecţioasă (tabloul sanguin — vezi *2.2.1.1.3.2.* — şi reacţia de eterohemoaglutinare Paul-Bunnel, cu diversele variante); diferenţierea unor viroze veziculoase (de ex., herpes, varicelă, zonă) de variolă, prin punerea în evidenţă în leziunile respective de celule gigante; diagnosticul virozei citomegalice, prin punerea în evidenţă în sedimentul urinar de celule cu incluziuni mari caracteristice (vezi cap. *2.3.*).

3.2.3. FUNGI (CIUPERCI PARAZITE) ŞI MICOZE

3.2.3.1. OBSERVAŢII GENERALE

Fungii, mucegaiurile, levurile sau ciupercile macroscopice şi microscopice sînt foarte răspîndite în natură, în sol, pe obiecte. Sînt comensali, saprofiţi sau paraziţi ai plantelor şi animalelor. Se cunosc aprox. 50 000 de specii, dintre care cel puţin aprox. 50 pot fi patogene pentru om. Utilizarea largă a substanţelor antimicrobiene şi, în special, a antibioticelor, scăderea rezistenţei locale, mai ales, fenomenele de imundepresie patologică sau medicamentoasă au dus, în ultimii ani, la creşterea micozelor şi la mărirea agresivităţii lor. Numeroase micoze inocente, cantonate numai superficial pe tegumente şi pe mucoase, pot deveni extensiv patogene şi pot produce diseminări hematogene. Micozele sistemice sînt, deseori, urmarea unui tratament intens şi prelungit cu antibiotice, a unui tratament imundeprimant, a unor cateterisme venoase, a unor intervenţii chirurgicale cardiovasculare etc. Evoluţia micozelor şi gravitatea lor poate varia de la perfecta toleranţă, la forme benigne, grave, foarte grave şi chiar mortale.

Fungii sînt vegetale mai mari decît bacteriile, nu au rădăcini, nici clorofilă, se reproduc prin spori şi se compun dintr-o parte vegetativă şi una reproductivă, capabilă de a face spori.

— *Partea vegetativă,* de bază, denumită tal *(thalus)* sau miceliu, este compusă dintr-o masă de formaţiuni tubulare (septate sau aseptate), denumite hife *(hyphae).*

— *Partea reproductivă* poate fi asexuată (fungi imperfecţi) sau sexuată (fungi perfecţi). În forma asexuată (care reprezintă majoritatea fungilor patogeni sau oportunişti), sporii se pot forma direct prin fragmentarea hifelor (artrospori) sau printr-o înmugurire a hifelor (blastospori), sau printr-o transformare a unor hife terminale într-o formaţiune ce rămîne ataşată de hifă (chlamidospori). Hifele terminale septate se pot transforma în formaţiuni speciale, *conidiofori,* care produc conidii uni- sau pluricelulare (micro- sau macroconidii). Hifele neseptate se pot transforma în *sporangiofori,* care conţin sporangii.

Scanned with OKEN Scanner

Sporularea sexuată se produce la fungii perfecţi, prin diferite formaţiuni : oospori, zigospori etc. Sînt mai rar patogeni pentru om (fig. 70).

Formaţiunile reproductive sînt caracteristice şi constituie criteriul hotărîtor, pentru recunoaşterea şi clasificarea fungilor.

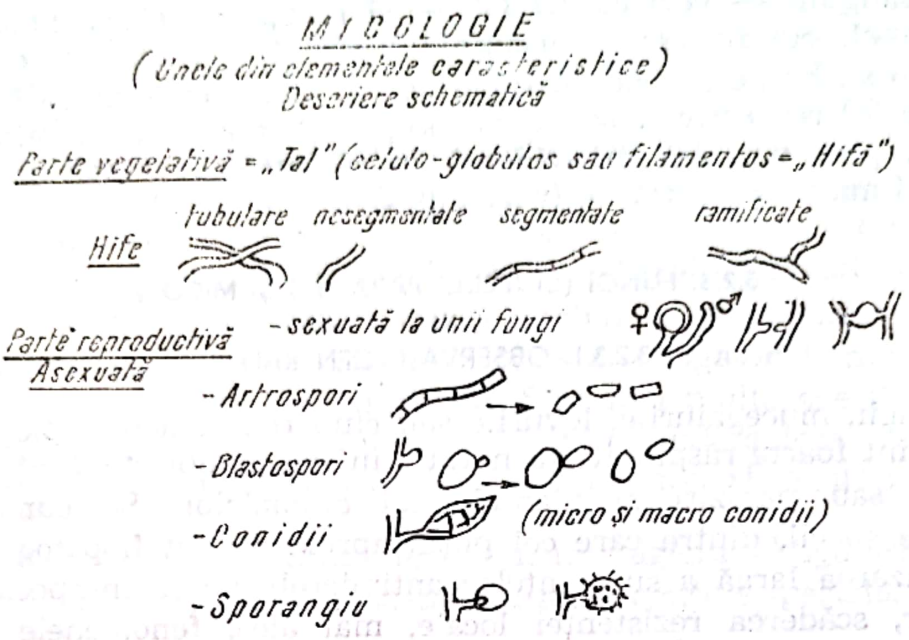


Fig. 70. — Micologie (descriere schematică).

Fungii pot fi : *filamentoşi,* cu aspect pufos, vătos, mucegaiuri ; *levuriformi,* cu celule izolate, care se reproduc prin înmugurire ; *dimorfi,* care iau aspect levuriform (în culturi la 37° şi prin parazitism în ţesuturi) şi filamentos (în culturi la 25—30° şi în sol).

Există cîteva afecţiuni, care au caractere asemănătoare micozelor, produse însă de bacterii filamentoase şi ramificate ca Actinomyces (vezi 3.2.1.7.4.5.), Nocardia (vezi 3.2.1.7.2.4.) şi altele. Ele produc ulceraţii şi supuraţii cronice. În puroi, se pot vedea granule galbene (ca sulful), compuse din mici colonii de germeni. Aceste bacterii sînt sensibile la antibioticele antibacteriene şi cresc pe medii de cultură obişnuite. Din cauza asemănării cu micozele, aceste infecţii au fost denumite de unii autori „pseudomicoze".

Examenul micologic elementar se compune, în primul rînd, din studiul direct, microscopic al *produsului patologic necolorat* (raclare dintr-o zonă bolnavă, spută, secreţie bronşică, spălătură gastrică, puroi, exsudate, L.C.R., lichid pleural, urină etc.). O mică cantitate din produsul patologic este pus pe o lamă portobiect ; se acoperă cu o lamelă şi se examinează cu obiectiv mic şi apoi cu unul mare, avînd grijă să se coboare condensatorul, pînă se obţine imaginea cea mai bună. Dacă produsul este prea opac, se adaugă o picătură de NaOH 10/100, încălzit puţin. Se urmăresc fragmentele miceliene, dacă au septuri (Aspergillus şi Penicillium), sau dacă nu au septuri (Mucor etc.) ; dacă au artrospori

(Geotrichum), celule rotunde cu înmugurire (Candida, Cryptococcus etc.). În fine, se studiază prezența de *conidii* (macro- sau microconidii).

În continuare, se examinează preparatul colorat cu Gram (miceliile și sporii sînt grampozitivi), colorat cu Giemsa (pentru decelare de Histoplasma) și preparat cu tuș de China pentru preparate din L.C.R. (Cryptococcus).

Mai departe, se pot face culturi pe mediu Sabouraud lichid și solid și multe altele. Culturile, făcute în dublu se incubează separat la 37° și la 25—30°. Manipulările culturilor trebuie făcute cu grijă, pentru a evita pericolul unei contaminări a operatorului (mai ales cu Histoplasma).

Pentru studiul micozelor sistemice, trebuie de obicei să se recurgă la secțiuni și la colorare cu acid periodic Schiff (PAS).

Micologia este o specialitate complexă și des pretențioasă a patologiei clinice și a microbiologiei. Clinicianul nu se poate transforma într-un micolog amator, prin simplul examen microscopic al unui produs patologic. (El are însă rolul de a asigura o recoltare cît mai corectă a produsului patologic cel mai reprezentativ și mai puțin supracontaminat, precum și rolul de a interpreta rezultatul, împreună cu medicul de laborator.)

Acest examen, cu toată utilitatea lui, este cu totul insuficient și des necaracteristic ; din această cauză, trebuie să se recurgă la un micolog de specialitate, care va completa examenul direct cu culturi, studii complementare ale coloniilor, prin reacții serologice, intradermoreacții sau/și prin inoculări la animale, și prin studiul, eventual, al sensibilității la chimioterapice și antibiotice.

Avînd în vedere larga răspîndire în natură a acestor fungi, este greu să se stabilească dacă prezența lor într-un produs patologic sau pe un mediu de cultură este o supracontaminare întîmplătoare sau nu, precum și dacă ei au sau nu un rol patogen. Mai mult, uneori, chiar tratarea unei micoze saprofite, poate — prin tulburările ecologice produse de tratament — să o transforme din saprofită în patologică.

Din punct de vedere clinic, *micozele* pot fi împărțite, în mod schematic, în funcție de localizarea lor în : micoze superficiale, micoze subcutanate, micoze oculare și micoze de largă răspîndire, care în funcție de organismul-gazdă și de mediul înconjurător, sistemic, pot să se prezinte sub diverse forme, și pot produce infecții locale sau sistemice. Este de observat că același agent poate avea mai multe și variate localizări.

De multe ori, același tablou clinic poate fi produs de mai multe specii de agenți micotici. Menționăm, în continuare, cîteva din caracterele morfologice (microscopice), mai ușor de recunoscut pentru nespecialist, care permit în oarecare măsură recunoașterea unora dintre fungii paraziți mai des întîlniți.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.3.2. DERMATOMICOZE

În *micoza superficială* (păr și stratul superficial al pielii), citățm doar 3 genuri (care au numeroase specii).

3.2.3.2.1. Microsporum. Sînt caracterizați prin macroconidii mari fuziforme cu pereți groși și septați (fig. 71).

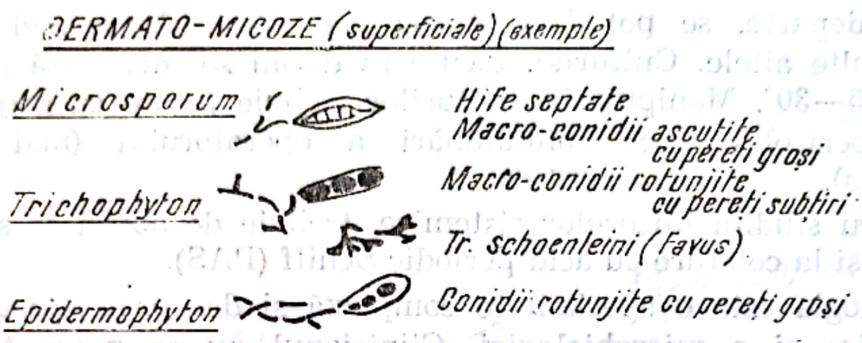


Fig. 71. — Dermatomicoze superficiale.

3.2.3.2.2. Tricophyton. Acești fungi au microconidii mai mici, sferice, cu capătul rotunjit, cu pereții subțiri la capătul unei hife sau a unei scurte ramificații ale ei. *Tricophyton schoenleinii*, agentul favusului, este lipsit de macro- sau microconidii ; dar are capetele hifelor îngroșate în mod caracteristic (vezi fig. 71).

3.2.3.2.3. Epidermophyton. Acești fungi prezintă macroconidii multe, multiseptate, cu capetele rotunde, pereți subțiri sau groși fără microconidii (fig. 71).

3.2.3.3. MICOZE SUBCUTANATE

3.2.3.3.1. Sporotrichoza este o micoză dimorfică, adică cu formă levuriformă parazitară în țesuturi și forma miceliană în culturi. Forma levuriformă, greu de pus în evidență prin microscopia obișnuită a produselor patologice (se recurge la colorații speciale sau imunfluorescente), se prezintă sub forma unor celule ovoide, dar cu capetele ascuțite. În forma miceliană, se vede o rețea fină de hife, cu microconidii ovoide, în buchete (fig. 72).

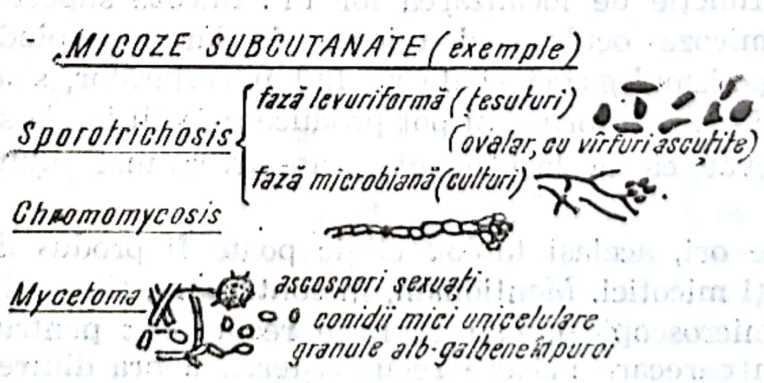


Fig. 72. — Micoze subcutanate.

3.2.3.3.2. Cromomicoza produce afecţiuni cronice ale pielii şi ale ţesutului subcutan, dar poate fi regăsită rareori în abcese cerebrale. Microscopic, se caracterizează prin hife multiseptate, cu pereţi groşi şi conidii rotunde, cu elemente aşezate grupate sau izolate (fig. 72).

3.2.3.3.3. Micetomul (maduromicoza) este o afecţiune granulomatoasă cronică, sub forma unor inflamaţii subcutanate, care se pot ulcera, localizate la membrele inferioare. Poate prospera din aproape în aproape, invadînd ţesuturile profunde şi chiar osul, necesitînd chiar amputaţia piciorului. Poate deveni invazivă, cu abcese viscerale şi cerebrale. Sînt 2 categorii de micetoame : micetomul tip actinomicotic, produs de diferite specii de Nocardia (vezi 3.2.1.7.2.4.) şi Streptomyces, care sînt bacterii, şi micetomul fungic, produs de diferite specii de fungi perfecţi (adică cu diviziune sexuată). Pot produce puroi cu granule galbene sau albe, compuse din micelii, cu septuri rare şi numeroase conidii izolate sau în conidiferi (vezi fig. 72). Primul tip de micetom poate fi sensibil la antibioticele antibacteriene, al doilea tip numai la substanţe antifungice.

3.2.3.4. MICOZE ALE OCHIULUI (KERATOMICOZE)

Aceste micoze sînt infecţii fungice ale corneei, prin infectare din afară, mai rar din vecinătate. Pot fi produse de cel puţin 80 de specii diferite (Fusarium, Candida, Aspergillus etc.). S-a semnalat o epidemie de keratomicoze după implantarea de lentile de contact contaminate. Diagnosticul şi identificarea acestor micoze cere neapărat ajutorul unui bun micolog specializat (fig. 73).

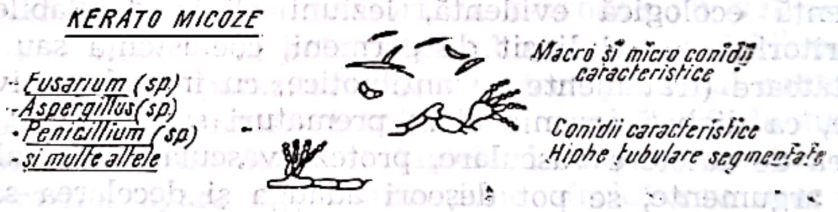


Fig. 73. — Keratomicoze.

3.2.3.5. MICOZE LEVURIFORME DE LARGĂ RĂSPÎNDIRE

Intră aici o serie de fungi levuriformi, care se pot găsi în natură, pe tegumentele şi mucoasele omului sănătos (şi ale animalelor), pe piele, unghii, gură, căi respiratorii superioare, tub digestiv, tract genitourinar. Pot produce leziuni superficiale, uneori extensive, în suprafaţă, în gură, faringe, esofag, bronhii, căi respiratorii inferioare, mucoasele anogenitale etc., mai ales la imaturi, bătrîni, persoane cu defect imunologic, tratamente imunsupresive, tulburări prin antibioticoterapie ale ecologiei florei saprofite normale. Aceste micoze pot deveni invazive, producînd septicemii, endocardite, meningite.

Scanned with OKEN Scanner

În această categorie, intră în primul rînd *Candida* (în special Candida albicans), *Geotrichum* și *Torulopsis* (fig. 74).

Avînd în vedere larga răspîndire a acestor fungi, chiar și la persoanele sănătoase și în mediul înconjurctor, cercetarea lor de rutinc în spută, de pe mucoasa bucofaringiană sau din scaun sau din tractusul genitourinar nu este indicată.

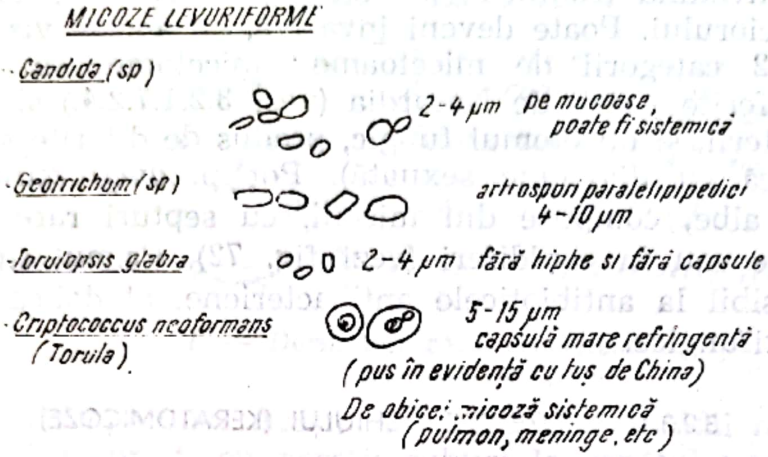


Fig. 74. — Micoze levuriforme.

Este greu de stabilit, dacă evidențierea unui asemenea agent sau dezvoltarea lui pe un mediu de cultură reprezintă un saprofit inocent, un contaminant întîmplător sau un patogen. Pentru a-i stabili rolul patogen, trebuie neapărat să existe în plus cît mai multe din argumentele următoare : număr mare de elemente micotice în produsul proaspăt, preponderență ecologică evidentă, leziuni clinic decelabile, localizate într-un teritoriu normal lipsit de germeni, coexistența sau urmarea de cauze ajutătoare (tratamente cu antibiotice, cu imundepresive, tulburări metabolice, ca diabet, uremie etc. ; prematuri sau bătrîni ; toxicomani, implantarea de catetere vasculare, proteze vasculare sau valvulare etc.). La aceste argumente, se pot deseori adăuga și decelarea sau creșterea de anticorpi specifici la bolnavul în cauză.

3.2.3.5.1. Candida. Acești fungi se evidențiază, în produsele patologice, sub forma unor levuri rotunde sau ovalare, mari de 2—4 µm, intens grampozitive, uneori întovărășite de fragmente pseudomiceliene, de asemenea grampozitive (vezi fig. 74). În culturi, apar pseudomicelii, blastospori și chlamidospori, cu pereții groși. Indentificarea candidelor și diferențierea lor de Geotrichum, de Trichosporum și de alți fungi se face de către micolog, pe baza unor criterii culturale și fermentative.

3.2.3.5.2. Geotrichum. Acești fungi se evidențiază în produsele patologice, în special în spută, dar și în gura și în intestinul normal, sub formă de artrospori, rezultați din fragmentarea hifei în fragmente paralelipipedice sau sferice intens grampozitive, de 4—10 µm (vezi fig. 74). Poate fi confundat cu Oospora, Coccidioides, Blastomyces și cu alți fungi și, din această cauză, pentru o corectă identificare, trebuie să se recurgă la culturi și la ajutorul unui micolog.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.3.5.3. Torulopsis apare în produsele patologice sub forma unor levuri rotunde sau ovale, grampozitive, de 2—4 μm ∅, des înmugurite. Nu sînt capsulate. Nu se văd hife.

3.2.3.6. MICOZE SISTEMICE

În mod schematic, micozele sistemice prezintă 3 tipuri clinice și anume : infecții *asimptomatice,* care pot interesa pielea, sistemul limfatic, sistemul osos sau orice organ, nedecelabile decît întîmplător, prin mijloace de laborator ; infecții *simptomatice,* care pot prezenta forme variate, cu simptome locale discrete sau mai mult sau mai puțin evidente sau chiar grave, care variază în funcție de localizare ; infecții *diseminate* sau *progresive,* care pot prezenta o simptomatologie discretă un timp mai îndelungat, pentru a trece în puseuri acute progresive, diseminate sistemic și care sînt deseori mortale.

Fungii cauzatori ai micozelor sistemice, ca și Candida, dar cu excepția fungului Cryptococcus neoformans, sînt difazici, adică se prezintă sub 2 forme distincte, și anume în natură ca saprofit sau forma *miceliană saprofită,* în timp ce forma *parazitară* sau *tisulară* invazivă este levuriformă. Cele 2 forme pot fi obținute și *in vitro* în diferite condiții culturale.

Principalele micoze sistemice sînt următoarele :

3.2.3.6.1. Criptococcoza (toruloza) este o micoză cronică sau subacută, care interesează în special plămînul, meningele și creierul și, rareori, și alte țesuturi. În natură, se găsește în excretele unor păsări (în special porumbei), mai ales în unele regiuni geografice. Spre deosebire de ceilalți fungi patogeni, acest fung nu se găsește la omul normal. Criptococcoza apare în special la imaturi, la persoane cu deficiență imunologică, la leucemici sau la bolnavi cu alte afecțiuni debilizante. Pentru punerea în evidență a parazitului, se amestecă produsul patologic (L.C.R. sau exsudat bronșic, uneori și urină), cu o picătură de tuș de China și se examinează între lamă și lamelă la microscop, cu obiectiv de imersie. Parazitul apare ca o formațiune sferică sau ușor ovalară de 5—15 μm ∅, înconjurată de o capsulă foarte groasă, refringentă (fig. 75). Pentru studii ulterioare, se pot face culturi și inoculări intraperitoneale sau intracerebrale la șoarece.

3.2.3.6.2. Coccidioidomicoza este o micoză mai frecventă în unele regiuni geografice (în special în America de Sud și Centrală), uneori asimptomatică sau sub forma unor infecții acute, dar benigne, și limitate spontan la tractul respirator. Se poate disemina la diferite viscere, țesut osos, limfatic sau cutanat. Infecția umană se face prin inhalare de artrospori.

La examenul microscopic direct al produsului patologic (spută, L.C.R. etc.), fungul apare ca o sferulă cu pereți groși de cca 2 μm ∅ sau ca sporangium mari pînă la 200 μm cu endospori (vezi fig. 75). Pentru identificarea corectă, trebuie trecut la procedee culturale, dar de notat că manipularea materialului este periculoasă (infecții de laborator).

Scanned with OKEN Scanner

3.2.3.6.3. Histoplasmoza este o micoză dimorfică a sistemului reticuloendotelial, care poate invada ganglionii limfatici, plămînii, splina, ficatul, sistemul nervos central și alte organe. Histoplasma este un fung saprofit care există în sol, în excretele unor păsări și lilieci, în pivnițe, în peșteri etc. Poate infecta animalele și omul prin inhalarea de spori.

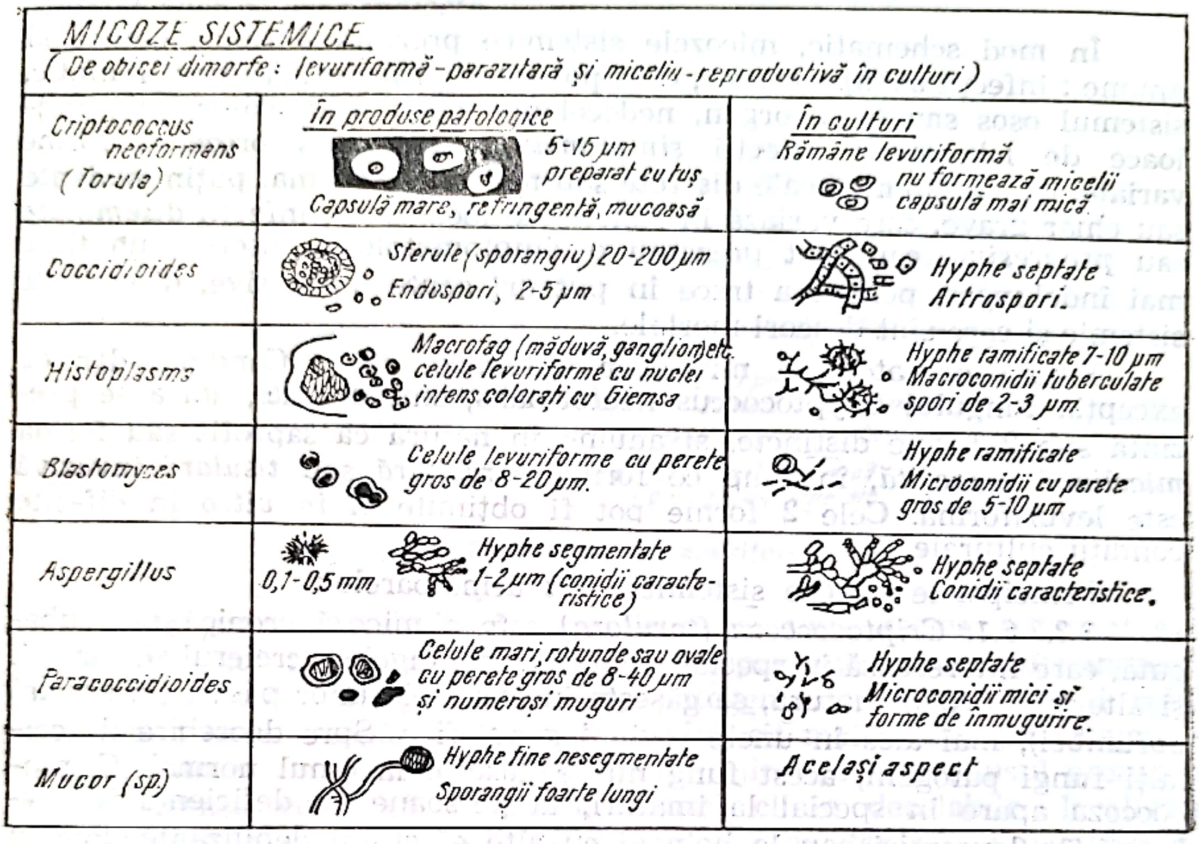


Fig. 75. — Micoze sistemice.

Boala este des asimptomatică sau evoluează ca o infecție benignă, mai ales în unele regiuni geografice, ca America Centrală. Histoplasmoza poate produce o pneumopatie cronică, uneori excavată, care poate simula o tuberculoză sau rareori produce o diseminare sistemică, de obicei mortală. Histoplasma se dezvoltă intracelular în sistemul reticuloendotelial și, rareori, se evidențiază forme levuriforme libere. Punerea în evidență se face colorînd cu Giemsa și examinînd microscopic cu imersie pulpă ganglionară, splenică sau hepatică, obținută prin biopsie sau puncție-biopsie, mai rar prin examenul concentratului leucocitar din sîngele circulant, al sedimentului din spălătură gastrică, al L.C.R. sau al sputei. Histoplasmele se prezintă ca o serie de formațiuni rotunde, de 2—4 µm ∅, intracelulare, cu protoplasma în formă de semilună, colorată în roșu și cu vacuole mari bine vizibile (vezi fig. 75). Se pot face culturi și inoculări la animale. Manipularea materialelor este periculoasă, fiind un risc important de infecții de laborator.

3.2.3.6.4. Blastomicoza nord-americană este produsă de un fung dimorfic, care evoluează la om sub forma unor granulomatoze cronice

și supurative ale plămînului, mai rar în alte țesuturi sau organe. Fungul Blastomyces se găsește în natură, în sol, în dejecțiile păsărilor și produce îmbolnăviri mai ales la fermieri. Boala este mai frecventă în unele regiuni geografice. Materialul patologic (puroi aspirat din leziunile subcutanate, spută, uneori și L.C.R.) poate fi examinat direct între lamă și lamelă cu obiectivul de imersie. Blastomyces apare sub forma unor sfere de 8—20 μm ∅, cu pereții groși și o înmugurire, care se leagă de celula — mamă printr-o bază largă (vezi fig. 75). Se pot face inoculări la animale și culturi, la care să apară faza miceliană.

3.2.3.6.5. Paracoccidioidomicoza (blastomicoza sud-americană) este o infecție cronică bucală și nazală, care poate cuprinde sistemul limfatic tributar sau poate da metastaze viscerale la distanță. Boala este mai frecventă în America de Sud și în America Centrală. La examenul direct microscopic, fungul apare sub forma unor formațiuni levuriforme, mari de 10—40 μm ∅, rotunde sau ovalare, cu pereții groși retractili și cu înmuguriri multiple caracteristice (vezi fig. 75).

3.2.3.6.6 Aspergiloza. Aspergillus (*A. fumigatus* în special) este un fung de largă răspîndire în natură, pe obiecte, pe vegetale și poate fi găsit pe tegumente și mucoase, contaminînd incidental și mediile de cultură. Aspergiloza poate să ia aspectul unor granulomatoze des supurative ale tegumentelor, ale obrazului (ureche, cornee, sinusuri, orbită), ale plămînului, sau ale altor viscere. Boala apare în special la persoane din mediul rural sau la debili, la cei supuși la tratamente cu antibiotice, cu corticosteroizi sau cu imundeprimante.

Examenul microscopic direct al produsului patologic (puroi, spută, aspirat din focar) poate pune în evidență fragmente de hife septate, ramificate și uneori cu conidii la extremități.

3.2.3.6.7. Mucormicoza este o boală rară, dar deseori fatală, care afectează plămînul, creierul, mai rar alte organe. Este produsă de un fung de obicei saprofit, nepatogen și eventual contaminant al mediilor de cultură. Se prezintă sub forma unor micelii aseptice cu sporangiofori lungi, terminați în sporangii („saci" cu spori) (vezi fig. 75).

3.2.4. PARAZIȚI ȘI PARAZITOZE

În natură, există mii de feluri de paraziți, dintre care sute de specii pot parazita omul. Răspîndirea geografică a parazitozelor este inegală și depinde de condiții geoclimatice, cu posibilitățile de existență și dezvoltare a oaspeților intermediari, a unor focare naturale, și de condițiile sociale ale populației.

Foarte des, parazitismul este compatibil cu o stare de sănătate perfectă sau cu o simptomatologie minoră și necaracteristică. Alteori, parazitismul se traduce prin diferite tulburări digestive (astenie, anemie, alterarea stării generale), care pot duce uneori treptat la tulburări grave de nutriție și chiar la caşexie.

În sfîrșit, parazitismul poate fi grav, foarte periculos și chiar mortal, din cauza unor localizări viscerale (fortuite sau obligatorii) în ficat, plămîn, ochi, sînge, organe hematopoietice, sistem limfatic, meninge

Scanned with OKEN Scanner

și sistem nervos central. Chiar și în aceste condiții, simptomatologia este legată mai degrabă de localizare decît de felul parazitului. Fac excepție : malaria, tripanosomiazele, leishmaniozele, schistostomiazele, filariozele și puține altele. Diagnosticul parazitozelor intestinale nu constituie de obicei o urgență medicală, în schimb, diagnosticul parazitozelor hematogene, în special al malariei, trebuie executat întotdeauna de urgență, deoarece de el depinde uneori viața bolnavului.

În toate parazitozele, ancheta epidemiologică este de mare însemnătate, avînd în vedere în special distribuția geografică a unor parazitoze și condițiile deseori speciale de contractare a acestor boli. Uneori, diagnosticul clinic devine ușor, de îndată ce medicul se gîndește la posibilitatea unei anume parazitoze.

Diagnosticul parazitozelor se face, în general, prin punerea în evidență și recunoașterea morfologică a parazitului respectiv (adult, larvă, ouă sau chist). Majoritatea paraziților se dezvoltă în tubul digestiv și, din această cauză, trebuie căutați în scaun cu tehnici speciale coprologice, uneori în bilă și chiar în spută. O serie de alți paraziți, se pot găsi în sînge, în organe hematopoietice, în sistemul limfatic, în ganglioni și splină, rar în diverse viscere.

Dintre toate parazitozele posibile, vom cita doar puține, care sînt mai frecvente sau mai periculoase, dacă nu sînt recunoscute și tratate la timp. Pentru fiecare, vom aminti, cu totul rezumativ, ciclul biologic al parazitului, oaspetele intermediar, rezervorul de infestație, localizările obișnuite și boala la om. Vom indica, de asemenea, ce trebuie recoltat, cînd și cum trebuie recoltat și cum trebuie prelucrat materialul patologic.

3.2.4.1. PARAZIȚI INTESTINALI ȘI AI ANEXELOR (FICAT, CĂI BILIARE) ȘI AI TRACTUSULUI GENITAL

Paraziții intestinali sînt, deseori, în cantitate mică. Paraziții, ouăle și chisturile se elimină uneori intermitent și pot fi mascați, deformați și de nerecunoscut, dacă recoltarea a fost necorespunzătoare. Recoltarea materiilor fecale, pentru examenul coproparazitologic, trebuie să se facă în mod repetat, de cel puțin 3 ori, de preferință chiar de 6 ori, la 1—2 zile interval. Se examinează porțiuni de aprox. 1 g (cît o alună), din scaunul emis spontan sau după un purgativ salin sau prin rectoscopie, înainte ca bolnavul să fi luat bariu, uleiuri minerale, antimalarice, chimioterapice sau antibiotice cu acțiune antiparazitară, sau se va aștepta 3—6 săptămîni, după terminarea acestor tratamente. Scaunul nu trebuie amestecat cu urină. Scaunul se recoltează în recipiente curate, bine închise cu capac. Scaunul poate fi infectant și se poate contamina și, din această cauză, trebuie manipulat cu respectarea tehnicii microbiologice de asepsie.

Examenul materiilor fecale, mai ales în cazul scaunelor lichide, ca și în cazul unor suspiciuni sau posibilități de amibiază, se face în decurs de 30 de minute de la *emiterea* scaunului (nu de la aducerea scaunului la laborator). În celelalte examene coproparazitare, examenul se poate face și după 24 ore de conservare la 35°. Dacă aceste condiții

Scanned with OKEN Scanner

nu pot fi realizate, rezultatele sînt mai nesigure. În aceste cazuri, se recomandă pentru cercetarea paraziților recurgerea la tehnici de fixare-conservare (soluții cu alcool polivinilic sau soluții de formol 10/100).

Pentru oxiuri și ouă de oxiuri, se folosește recoltarea pe celofan sau pe banda adezivă din regiunea anală (vezi *2.8.0.0.2.).*

Analiza parazitologică începe totdeauna prin examenul direct macroscopic al produsului proaspăt ; urmează apoi examenul produsului proaspăt, nativ, necolorat, examinat între lamă și lamelă la microscop, cu obiectiv uscat (×10 și apoi ×40) și cu condensatorul lăsat în jos. Astfel, se poate studia motilitatea trofozoiților, care reprezintă faza mobilă a unor protozoare. De notat că motilitatea acestora, în special a amibelor, este redusă sau anulată, dacă preparatul se răcește (pentru menținerea căldurii, se pot plasa pe platina microscopului 2 monede încălzite la 37°). Optica microscopului trebuie calibrată, pentru aprecierea dimensiunii formațiunilor decelate (vezi *2.8.0.0.3.2.).*

În continuare, se pune la marginea lamelei o picătură de Lugol concentrat * sau/și proaspăt diluat 1/5 din soluția-mamă. Colorarea protozoarelor se poate face acoperind preparatul umed de pe lamă timp de 5—10 minute cu o soluție de albastru de metilen acid **.

În continuare, se folosește tehnica Kato și Miura (vezi 2.8.0.0.3.2.), folositoare pentru decelarea ouălor de helminți, dar nu a larvelor și a protozoarelor.

Se recomandă călduros, atunci cînd se caută protozoarul și în special amibe, să se facă și preparate fixate și colorate, care pot fi reexaminate ulterior. Tehnica de electie este cu o soluție cu alcool polivinilic (P.V.A.), a cărei preparare este însă pretențioasă și nu este deocamdată decît la îndemîna laboratoarelor de parazitologie, care vor mai folosi, după caz, și o serie de alte tehnici speciale.

3.2.4.1.1. Helminți. Paraziți intestinali vizibili cu ochiul liber (vezi fig. 76).

3.2.4.1.1.1. Ascaris lumbricoides este un nematod, adică un vierme cilindric, cu extremități ascuțite ***. Parazitul adult măsoară 15—26 cm lungime, pe 0,5 cm grosime, și se găsește de obicei în intestin, uneori în mase mari, care pot provoca tulburări mecanice. Poate migra către intestinul terminal, eliminîndu-se spontan prin scaun. Alteori, mai ales în unele stări hiperpiretice, se poate elimina și prin vărsături. Diagnosticul se face prin examen microscopic al scaunului, în care se evidențiază ouă caracteristice (vezi fig. 54). Infestarea se poate face pe cale

* Se dizolvă 1 g iodură de potasiu în 100 ml apă distilată, apoi se adaugă iod cristalizat, pînă se obține o soluție saturată, cca 1,5 g iod, cu un mic exces de iod nedizolvat, care rămîne pe fundul sticlei. Soluția se păstrează în sticlă colorată. Prin colorare cu iod (lugol), citoplasma chisturilor apare galben-aurie, glicogenul se colorează în brun, iar nucleii rămîn necolorați, sub forma unor mase refractare.

** 0,06 g albastru de metilen dizolvat în 100 ml soluție tampon acid acetic-acetat de sodiu pH 3,6 (tamponul se obține, amestecînd 46,3 ml soluție acid acetic 0,2 mol cu 3,7 ml scluție acetat de sodiu 0,2 mol).

*** Există în natură numeroase specii, adaptate la diferite animale, în afara omului.

orală, prin alimente care conțin ouă. Ouăle în tubul digestiv pierd învelișul lor, iar larvele se fixează de mucoasa intestinală, pătrund prin ea și intră în torentul circulator ; ajunse în plămîn, larvele pot produce o reacție locală (infiltratul pulmonar cu eozinofile) și migrează, în continuare, ascendent în arborele traheobronșic, sînt înghițite odată cu saliva și reajung în intestin, unde devin paraziți adulți.

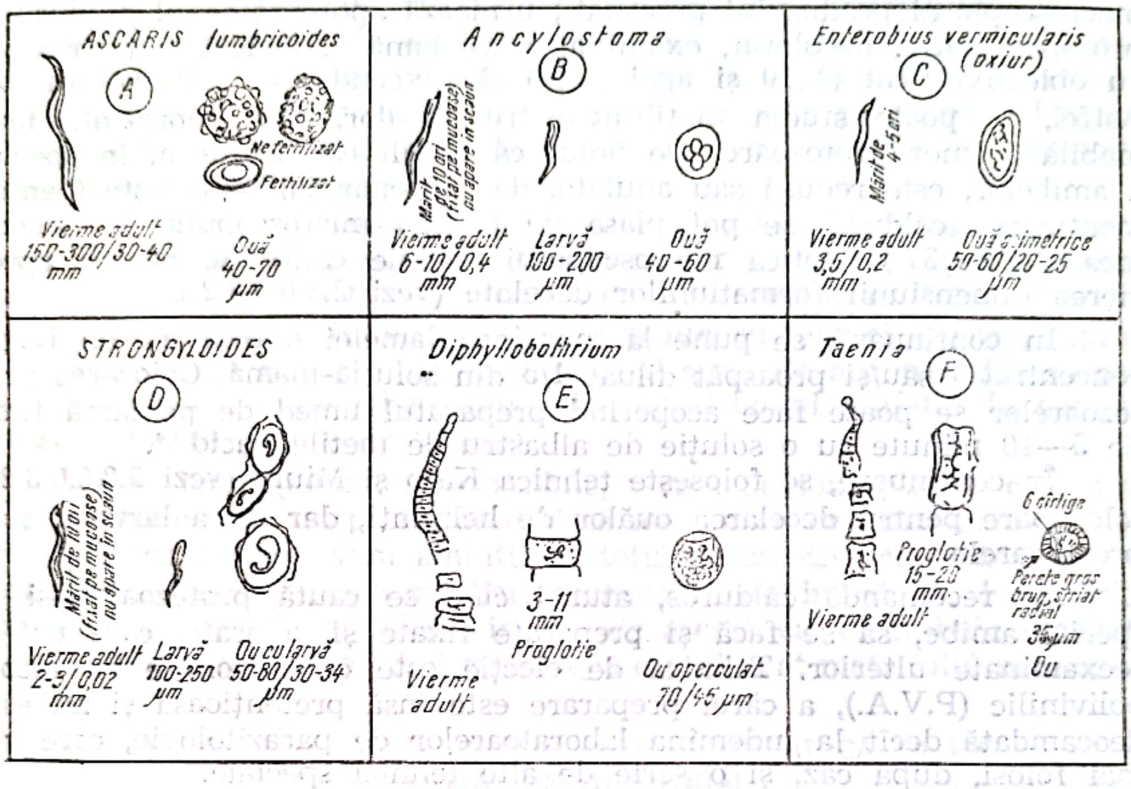


Fig. 76. — Paraziți intestinali (helminți).

Unele larve pot fi antrenate în circulația sanguină, putînd produce fenomene generale, în special la copii (febră, tuse, infiltrat pulmonar cu eozinofile, convulsii, meningism etc.), sau se embolizează în diferite țesuturi, unde însă nu găsesc condiții de dezvoltare (excepțional, se pot dezvolta, realizînd un tablou de „larva migrans", boală rară care de obicei este produsă de alți viermi). Același ciclu (sînge-plămîn-esofag-intestin) se produce și la o serie de alți viermi ca Ancylostoma și Strongyloides, cu deosebirea că primoinfecția se face prin trecerea larvei prin piele.

Ascaridoza este o boală a omului și infestarea este de tip fecal-oral. Diagnosticul se pune pe prezența de ouă sau de viermi adulți în scaun.

3.2.4.1.1.2. Ancylostoma duodenale este un nematod. Parazitul adult măsoară 1—1,5 cm lungime și 0,5 mm grosime și se găsește în partea superioară a intestinului subțire. Se poate elimina prin scaun, dar de obicei se găsesc în scaun ouă, din care în natură (și în condiții de creștere în laborator) ies larve rhabditiforme mobile, care pot străbate pielea și pot începe ciclul sînge-plămîn-esofag-intestin. Pentru eclo-

Scanned with OKEN Scanner

zionare, este necesar să existe condiţii speciale de umiditate, căldură şi întuneric ; pentru propagarea bolii, este necesar ca larvele să poată ajunge la pielea omului, care va fi parazitat. Aceasta explică de ce boala era frecventă în minele de cărbuni, cînd minierii erau desculţi. Diagnosticul se pune prin examenul microscopic al scaunului, unde se evidenţiază ouă caracteristice (vezi fig. 54). Dacă scaunul este păstrat cîteva ore, ouăle eclozează, apărînd larve rhabditiforme, asemănătoare cu larvele de Strongyloides.

Anchilostomiaza este o boală a omului. Infecţia este de tip fecal-transcutanat-digestiv.

3.2.4.1.1.3. Enterobius vermicularis (oxiurul) este un nematod. Viermii adulţi măsoară în lungime 0,5—1,3 cm (femela) şi 0,5—0,25 cm (masculul) ; grosimea lor este de 0,2—0,5 mm. Ei trăiesc în intestinul terminal. Femelele ies noaptea din intestinul terminal şi depun ouăle, des embrionate, în regiunea anală şi perianală, producînd de obicei un prurit la acest nivel. Diagnosticul se poate face, uneori, prin observarea macroscopică a femelelor în vecinătatea anusului. De obicei, însă, diagnosticul se face prin examen microscopic al ouălor, care sînt caracteristice, turtite într-o parte (vezi fig. 54) şi care se recoltează prin tehnica benzii adezive de celofan (vezi *2.8.0.0.2.* şi fig. 51). Se pot evidenţia ouă prin raclarea regiunii subunghiale la copiii, care se scarpină noaptea în somn. Ouăle rezistă bine la desicaţie, pot persista în rufe de corp şi de pat şi în praf vreme îndelungată, continuînd să fie infestante. Infestarea se face direct sau indirect pe cale fecal-orală.

3.2.4.1.1.4. Strongyloides stercoralis este un nematod filiform *, foarte asemănător cu Ancylostoma duodenale şi cu Necator americanus. Viermele adult măsoară 1—2 cm lungime pe 0,2—0,3 mm lăţime. Femela rămîne fixată pe mucoasa intestinului subţire şi este ovovivipară. Ouăle sînt embrionate de 70/45 μm (fig. 76 şi 54). Din ouă ies larve rhabditoide (neinfestante). La examenul coproparazitar, se evidenţiază larve, dar rar ouă. Larvele rhabditoide suferă o transformare, devenind larve filariforme (sau strongiloide), formă sub care ele sînt infestante.

Ciclul natural al parazitului se poate face, fie în om, fie în sol, cu condiţia ca temperatura să depăşească 20°C. Larvele pot pătrunde în oaspetele definitiv prin piele (ca şi Ancylostoma) sau deseori la om, larvele ingerate cu alimente contaminate şi nefierte ajung în intestin, se împerechează şi femelele străbat mucoasa intestinală şi fac ciclul sînge venos-plămîn-esofag-intestin, unde se fixează, devin adulte şi elimină ouă embrionate, reîncepînd ciclul. Diagnosticul strongiloidozei se pune prin examenul microscopic coprologic direct sau prin cultivarea larvelor rhabditoide în mici cutii de plastic cu cărbune (tehnica Dăncescu).

Diferite specii de nematozi şi paraziţi intestinali, cu un ciclu de acelaşi tip, şi anume larve care trec din intestin în circulaţia portală, plămîn, apoi bronhii-esofag-intestin, pot trece mai departe în circulaţia sanguină arterială şi se pot localiza în diferite ţesuturi. Următoarele 3 sindroame pot fi produse de mai multe specii de paraziţi, prin trecerea lor în plămîn sau în circulaţia sanguină generală : infiltratul pulmonar cu eozinofile, larva migrans şi meningoencefalita cu eozinofile.

* Există în natură numeroase specii, adaptate la diferite animale, în afara omului.

3.2.4.1.1.5. Teniae (T. solium, T. saginata, T. granulosus). Acești paraziți sînt cestode (viermi plați în panglică), cu un cap (scolex) mic cu 4 ventuze (la Taenia solium și un inel de cîrlige), un trup (strobilă), compus dintr-un șir de mai multe proglote, mai lungi decît late, pe măsură ce se depărtează de scolex. Proglotele terminale sînt pline cu ouă și se elimină spontan (una cîte una la Taenia solium sau în fracțiuni de panglică la Taenia saginata). Ouăle sînt rotunde, mici cu un înveliș foarte gros, cu striuri radiale. Ouăle ingerate de un oaspete intermediar (de ex., porc sau vacă) eliberează embrioni hexacanți (oncosfere), cu scolex invaginat, care trec prin peretele intestinal în circulația limfatică, de acolo în acea sanguină, se disemineză și se localizează în diferite țesuturi, unde rămîn definitiv sau pînă cînd sînt ingerate de om sau de alt animal. Larvele, ajunse în intestinul omului, se fixează de mucoasă și dau naștere la un vierme, care devine adult și ciclul reîncepe.

Există multe specii de tenii patogene pentru om (și animale), care pot produce 3 *tablouri clinice* distincte, cunoscute sub 3 denumiri : *teniază,* denumire rezervată fazei intestinale a viermelui adult la om (cîine, vulpe etc.) ; *cisticercoză,* denumire reprezentînd faza de fixare a embrionilor hexacanți de Taenia solium în țesuturile oaspetelui intermediar (porc, mai rar alt animal, inclusiv omul) ; *hidatidoză,* denumire reprezentînd dezvoltarea viscerală a chistului larvar unilocular de Echinococcus granulosus (Taenia echinococcus), a cărui formă adultă de vierme intestinal este parazit al cîinelui, sau a chisturilor multiloculare de Echinococcus multilocularis, a cărui formă adultă de vierme intestinal este parazit al vulpii, din unele regiuni geografice (Bavaria-Tirol).

Taenia solium se dezvoltă în intestinul subțire (al omului). Are un scolex mic de 0,5—1 mm și o lungime totală de 2—3—8 metri. Proglotele adulte au 10—12 mm lungime, pe 5—6 mm lățime, și se elimină în mici fragmente de panglică. Ouăle sînt sferice, de 30—40 μm diametru, cu un perete gros, cu embrioni hexacanți (cu 6 cîrlige). Ajunși direct sau indirect în tubul digestiv al gazdei intermediare, care este de obicei porcul, rareori alt mamifer, produc cisticercoza, cu cele mai variate (și multe) localizări. Omul ingerînd carne cu cisticerci face teniază intestinală și ciclul reîncepe. Ciclul evolutiv poate fi variat : om-dejecții-porc ; om-șobolan-porc sau cu diverse alte animale intermediare.

Taenia saginata se dezvoltă în intestinul subțire (al omului), are un scolex de 1,5—2 mm cu ventuze, dar fără cîrlige. Viermele adult are 4—12, chiar 14 m lungime, cu proglote de 16—20 mm lungime, pe 5—8 mm lățime, care se elimină spontan, una cîte una. Ouăle sînt de 32—40 μm, cu perete gros și embrion hexacant. Larvele ajunse direct sau indirect la animalul intermediar (bovidee) produc cisticercoza bovinelor. Carnea cu cisticerci, ingerată de om, dă naștere la viermele adult și ciclul reîncepe.

Echinococcus granulosus este parazit intestinal al cîinelui, iar *Echinococcus multilocularis* este parazit la vulpea din unele regiuni geografice. Are un scolex cu 4 ventuze și cîrlige, iar viermele în între-

gime este scurt (3—9 mm), compus din 3—4 proglote. Ouăle cu embrioni hexacanţi au 30—35 μm ∅. Aceste ouă ingerate de alt animal produc chistul hidatic unilocular (sau multilocular). Ciclul poate fi cîine-om, cîine-cîine, pisică sau oricare alt animal.

Diagnosticul se pune prin descoperirea macroscopică de proglote sau de bucăţi de panglică în scaun sau pe rufăria de corp, sau prin descoperirea microscopică de ouă (fig. 76). Echinococoza şi hidatidoza se pot diagnostica clinic, radiologic, scintigrafic, iar uneori se descoperă întîmplător la necropsie.

Reacţiile serologice şi intradermoreacţia pot fi folositoare.

3.2.4.1.1.6. Diphyllobotrium latum (botriocefal) * este un cestod, adică vierme plat, compus dintr-un cap (scolex) de 3/1 mm, cu 2 ventuze alungite şi cu un trup (strobilă), în formă de panglică, compus din elemente (proglote) mai late decît lungi. Se dezvoltă în intestinul subţire şi produce o anemie hipocromă macrocitară pernicioasă, prin carenţă de vitamină B_{12}. Viermele adult măsoară între 4 şi 10 m. Se elimină prin scaun porţiuni mai mult sau mai puţin lungi, compuse din proglote, conţinînd un număr mare de ouă ovale de 70/45 μm, cu un opercul greu vizibil (vezi fig. 76). Diagnosticul se pune prin examenul scaunului macroscopic (fragmente de panglică) şi microscopic (proglote izolate şi ouă).

Ciclul natural comportă mai multe etape. Viermele adult trăieşte în intestinul omului şi al altor animale mîncătoare de peşte (cîini, pisici, păsări de baltă, de mare etc.). Ouăle se elimină prin fecale şi trebuie să ajungă în apa unde eclozionează şi se dezvoltă larve ciliate (coracidium) şi parazitează un prim oaspete intermediar, de obicei un mic crustaceu (un ciclop sau eventual un molusc). Aceştia sînt ingeraţi de un al doilea oaspete intermediar, un peşte (ştiucă sau un alt peşte), unde persistă vreme îndelungată. Felul oaspeţilor intermediari variază cu aria geografică : animale de apă dulce, de apă sărată etc. Omul se infestează mîncînd peşte crud, afumat sau insuficient fiert.

3.2.4.1.1.7. Tricocefaloza (trichuriaza) este o parazitoză intestinală, datorată nematodului *Trichiuris trichiura* (denumire anterioară *Trichocephalus dispar).*

Parazitul adult măsoară 30—40 mm şi trăieşte în intestinul subţire, unde se implantează prin una din extremităţile lui. Produce ouă caracteristice de 50—22 μm cu două „dopuri" (fig. 54). Ciclul evolutiv este fecal-oral. Ouăle sînt foarte rezistente în natură, putînd da naştere la larve infestante chiar după 5 ani. Omul este principalul rezervor de infestaţie, dar o serie de animale domestice pot fi de asemenea parazitate. Diagnosticul se face prin descoperirea microscopică a ouălor în scaun.

3.2.4.1.2. Paraziţi cu localizări extraintestinale

3.2.4.1.2.1. Trichinella spiralis, un nematod, provoacă o parazitoză intestinală trecătoare cu localizarea definitivă în muşchi (trichineloza). Este o parazitoză a porcului, a multor alte animale carnivore şi omni-

* Există în natură numeroase specii adaptate la diferite animale în afara omului.

vore, inclusiv și a omului. După ingestia de carne infestată cu larve închistate (uneori, la limita vizibilității cu ochiul liber, dar vizibile cu lupa și microscopic cu obiectiv uscat), se produce în stomac digestia învelișului și larvele se fixează în intestin, transformîndu-se în 4—5 zile în viermi adulți. Femela depune larve (este vivipară). După împerechere și depunerea de larve, paraziții adulți mor și se elimină spontan prin scaun. Larvele trec prin mucoasa intestinală, intră în vasele limfatice, trec în sînge și se fixează hematogen în țesutul muscular.

Faza de incubație sau intestinală se petrece în primele aprox. 10 zile de la ingestia infestantă și se traduce clinic prin : tulburări digestive, edeme ale feței, febră, dureri musculare, alterarea stării generale, eozinofilie. În zilele următoare, larvele se localizează în mușchi (fig. 77), se închistează și încep să se calcifice, timp de mai multe luni sau ani. În natură, se pot produce diferite cicluri evolutive, în funcție de mediu (porc-om, porc-porc, porc-șobolan-porc etc.).

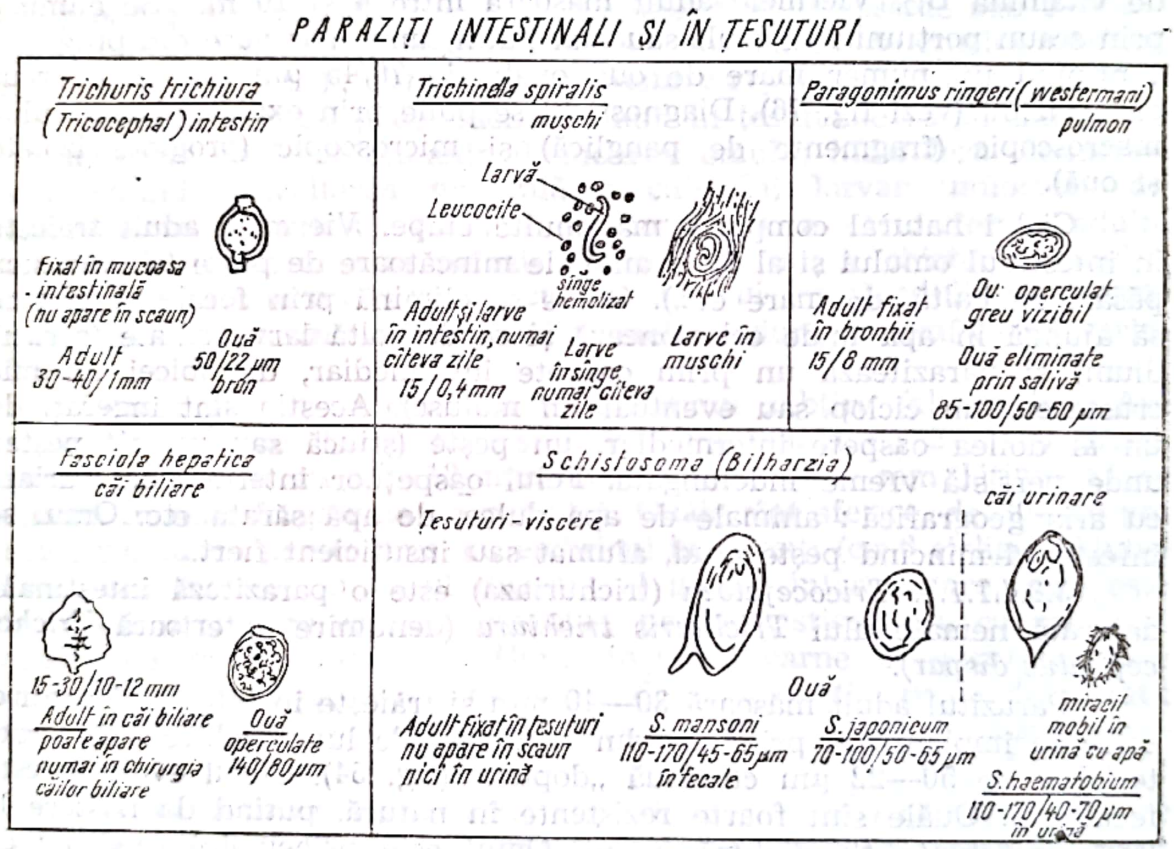


Fig. 77. — Paraziți intestinali și în țesuturi.

Diagnosticul se pune pe date epidemiologice, anamnestice, clinice, pe o *eozinofilie* considerabilă (40—70%) și pe descoperirea larvelor prin biopsie musculară. Examenul coprologic este pozitiv, în mod trecător, iar recunoașterea microscopică a larvelor este dificilă. În faza diseminării hematogene, între a 6-a și a 14-a zi de la infestare, la începutul fazei febrile, se pot evidenția larve în sîngele periferic, prin examenul microscopic cu obiectiv uscat al sedimentului din sîngele hemolizat. După

a 2-a lună, și timp indefinit, se găsesc larve închistate în mușchi (vezi fig. 77). Se mai pot folosi, pentru diagnostic, reacții imunologice.

3.2.4.1.2.2. Paragonimus westermani este un vierme, care adult măsoară 7—20 mm/3—6 mm și este hermafrodit. Paragonimiaza este o parazitoză (intestinală trecătoare), cu localizare definitivă pulmonară cronică, explicînd simptomatologia clinică, care poate simula uneori o tuberculoză. Parazitul se dezvoltă în parenchimul pulmonar, iar ouăle operculate de 60—90 μm se elimină prin spută (fig. 77). Din ouă, iese un prim stadiu ciliat și mobil (miracidium) de 140/80 μm, care parazitează un prim oaspete intermediar un molusc (diverși melci de apă dulce) și se transformă într-un sporocist, care dă naștere la *redia primară*, care se transformă în redia-fiică, care se transformă în microcercarii libere în apă. Ele parazitează al doilea oaspete intermediar, un crab sau un alt crustaceu de apă dulce, unde se închistează (metacercarii). Din crabii cruzi, ingerați de oaspetele definitiv (de ex., om sau alt mamifer), se eliberează, trec prin peretele intestinal în cavitatea peritoneală și apoi transdiafragmatic ajung în plămîn, unde ajung la maturitate formînd cavități chistice.

Sînt foarte numeroase specii de paraziți și foarte numeroși oaspeți intermediari, care diferă de la o regiune geografică la alta. Diagnosticul poate fi bănuit din datele epidemiologice și clinice și din examenul radiologic pulmonar. Diagnosticul exact se pune prin examen microscopic al sputei, în care se evidențiază ouă operculate.

3.2.4.1.2.3. Fasciola hepatica și alte specii de Fasciola sînt viermi plați (trematozi), în „formă de frunză", de dimensiuni variate, în funcție de specie, între 1,5 și 7 cm, hermafroditi, care se dezvoltă în căile biliare ale mamiferelor ierbivore și a celor ichtiofage (care mănîncă pește crud). Fasciola hepatica adultă este de 2—3 cm lungime și poate trăi în căile biliare, timp de 9—14 ani. Este un trematod hermafrodit cosmopolit. Are ouă operculate de 140 μm/80 μm, care se elimină prin scaun și din care iese un miracidium, care parazitează un molusc de apă dulce, se transformă pe rînd în sporocist, în redia, în redia-fiică și în cercarii, care își pierd coada și se transformă în metacercarii, care se închistează pe diferite ierburi acvatice, de unde pot fi ingerate de ierbivore și de om (de ex., salată) (vezi fig. 77).

Diagnosticul se face prin punerea în evidență a ouălor operculate în scaun sau în lichidul duodenal. În intervenții chirurgicale pe căile biliare, pentru icter obstructiv, se pot găsi paraziți adulți prin exprimarea ficatului sau raclarea unor căi biliare principale.

Distomatoza (fascioloza) bucofaringiană apare în zonele calde la unele populații, care ingeră ficat crud de miel sau beau apă din bălți poluate. Paraziții se fixează pe mucoasa bucală și faringiană, producînd o inflamație locală, care de obicei cedează spontan în cîteva ore sau zile. Rareori, poate produce tulburări grave de deglutiție și chiar asfixie. Diagnosticul se face prin examenul direct macroscopic al cavității bucofaringiene, unde paraziții plini de sînge apar ca mici lipitori.

3.2.4.1.2.4. Schistosoma (S. haematobium, S. japonicum, S. mansoni) provoacă schistosomiaza (bilharzioza), parazitoză sistemică, transcutanată trecătoare, foarte frecventă în țările calde (Africa și Asia). Localizarea definitivă se face în vasele venoase splanhnice, în special vezicale și peri-

vezicale *(Schistosoma haematobium)*, în sistemul arteriovenos visceral abdominal, în creier, plămîn, ficat, intestin etc. *(S. japonicum)* sau în ficat *(S. mansoni)*.

Paraziții adulți se găsesc numai în vasele sanguine viscerale și măsoară : masculul, între 10—25 mm ; femela, între 7,5 mm și 25 mm. Ei au o distribuție preferențială, în funcție de specie (vezi mai sus). Ouăle sînt ovoide de 160/50 μm, cu un pinten terminal (S. haematobium) sau lateral (S. mansoni) sau rotunde, mai mici de 50/60 μm (S. japonicum), cu un foarte mic pinten lateral (vezi fig. 77).

Ouăle depuse de-a lungul multor ani în venule produc o iritație tisulară cu granuloame pseudotuberculoase, scleroză sau chiar ulcerații, cu localizarea preferențială, dar nu absolută, citată mai sus.

Schistosoma haematobium produce leziuni vezicale, hematurie, iar ouăle se elimină prin urină. *Schistosoma japonicum* poate produce leziuni în toate viscerele : creier, plămîn, ficat, splină, plexuri vasculare subperitoneale și periperitoneale. Ouăle se elimină prin scaun, uneori și prin spută. *Schistosoma mansoni* produce leziuni hepatice, splenice, în plexurile mezenterice, colon și rect, iar ouăle se elimină prin scaun. Schistosomiaza netratată poate dura 5—18 ani sau poate duce la moarte (S. japonica) mai curînd.

Ouăle eliminate de gazda definitivă prin urină și fecale eliberează în apă miracidii ciliați, care înoată în apă și se fixează și pătrund în oaspetele intermediar, un molusc, a cărui specie variază în funcție de fauna ariei geografice respective. În moluscă, miracidiul se transformă în sporocist-mamă, care eliberează sporociști-fii, care la rîndul lor se transformă în cercarii (cu o coadă bifurcată), puși în libertate în apă. Ei se fixează și pătrund transcutanat în cîteva minute în oaspetele definitiv (*omul* sau alt mamifer). La locul pătrunderii, se formează de obicei o papulă pruriginoasă. În organism, cercariile își pierd coada și se transformă în viermi adulți, care migrează pe cale limfatică și hematogenă, în mod preferențial, în diferitele regiuni indicate mai sus, în funcție de specie.

Diagnosticul se pune prin evidențierea ouălor caracteristice în urină (S. haematobium) sau în fecale (S. mansoni și S. japonicum) și, uneori, și prin prezență de miracidii (care nu trebuie confundați cu protozoare ciliate). Paraziții adulți nu pot fi puși în evidență decît în vasele sanguine viscerale.

Sînt multe alte specii de schistosome, cu diferite distribuții geografice. O specie înrudită (Bilharziella polonica) a fost descrisă în Europa. Oaspetele definitiv sînt rațele sau alte palmipede. Cercariile se pot fixa și pe pielea omului, producînd o „dermatită pruriginoasă a înotătorilor" în apele poluate.

3.2.4.1.3. Paraziți microscopici (protozoare) ai tractului digestiv, ai căilor biliare și ai tractului genital (fig. 78). Există numeroase specii de protozoare, care pot coabita în intestinul animalelor și al omului. Unele sînt relativ bine suportate altele însă pot fi patogene, producînd tulburări digestive locale sau tulburări la distanță. Citățm numai unele, mai frecvent întîlnite.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.4.1.3.1. Giardia lamblia (Giardia intestinalis) provoacă o parazitoză a căilor biliare şi a intestinului, larg răspîndită. Parazitul este un protozoar flagelat. Trofozoidul (forma adultă mobilă) este piriform, cu 5 flageli în partea anterioară şi 2 în partea terminală. Parazitul are partea ventrală concavă, 2 nuclei şi măsoară între 9—21 μm lungime şi 5—15 μm lăţime (fig. 78). Se divide prin sciziparitate. Chisturile sînt ovale cu 2 (şi apoi cu 4 nuclei) de 8—12 μm lungime pe 7—10 μm lăţime.

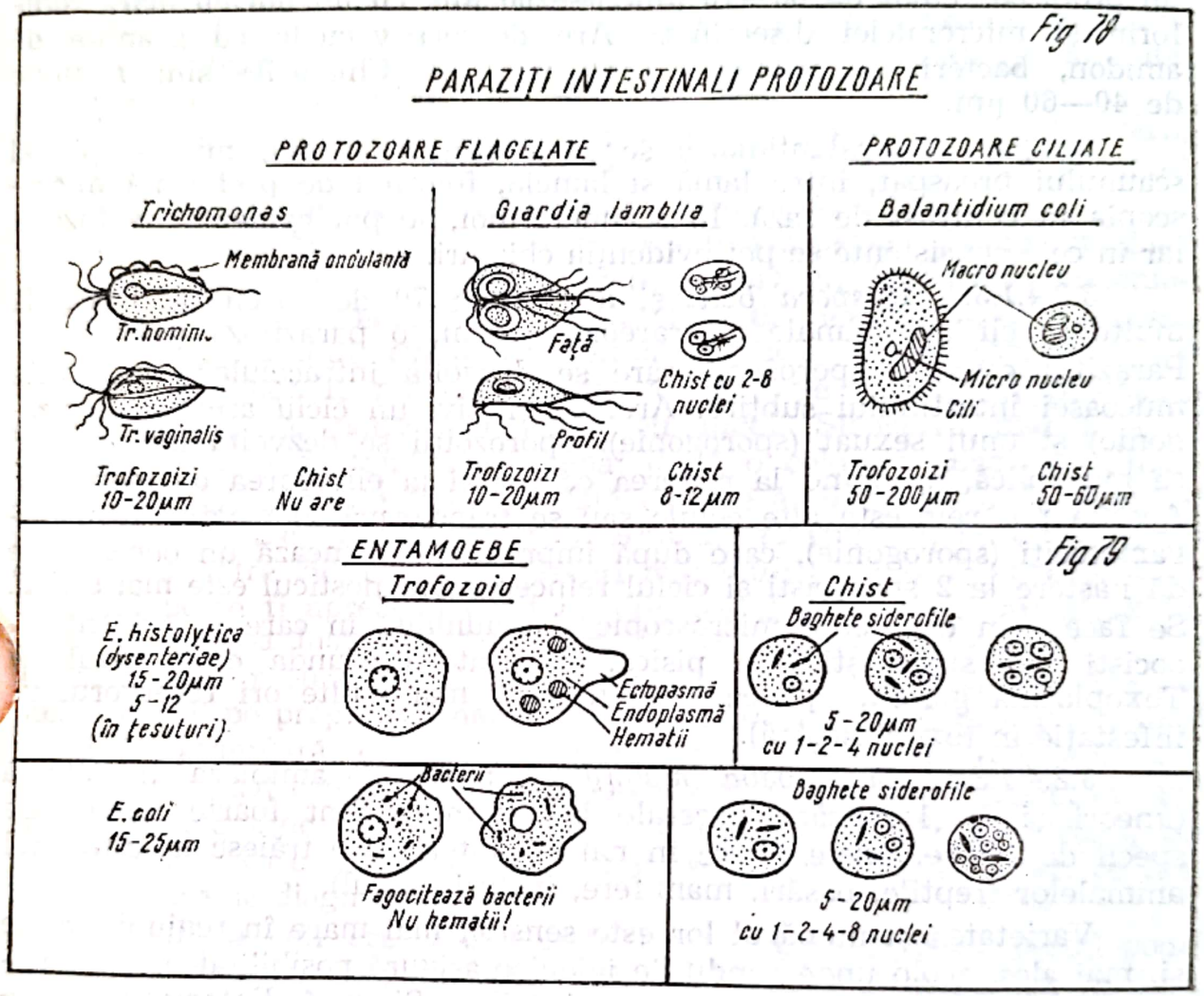


Fig. 78. — Paraziţi intestinali. Protozoare.

Fig. 79. — Entamoebe.

Diagnosticul se pune relativ uşor prin examenul microscopic al bilei (tubaj duodenal) şi al scaunului, cu care ocazie se pot observa trofozoiţii mobili sau chisturile cu aspect caracteristic. Lambliaza este de obicei asimptomatică sau se manifestă prin tulburări digestive şi biliare, tulburări de nutriţie, o stare de nervozitate sau depresie nervoasă. Giardiaza este uneori însoţită de eozinofilie.

3.2.4.1.3.2. Trichomonas vaginalis provoacă o parazitoză foarte răspîndită, mai frecventă la nivelul tractului genital la femei (trichomoniaza). *Trichomonas hominis* determină, mai rar, localizări la nivelul

Scanned with OKEN Scanner

intestinului terminal. Este datorată unui protozoar flagelat de 7—20 μm lungime și 5—10 μm lățime, cu 4 flageli în față și unul posterior. Are o mică membrană ondulantă (fig. 78). Nu formează chisturi.

Diagnosticul este relativ ușor prin examenul microscopic al secreției vaginale proaspete sau prin examenul coprologic microscopic, unde însă ar putea fi confundat cu alți protozoari flagelați intestinali (de ex., Chilomastix).

3.2.4.1.3.3. Balantidium coli provoacă o parazitoză intestinală. Este un protozoar ciliat de 60—70 μm/20—200 μm, cu un nucleu mare reniform și micronuclei diseminați. Are deseori vacuole cu granule de amidon, bacterii și eritrocite (vezi fig. 78). Chisturile sînt rotunde de 40—60 μm.

Diagnosticul balantidiazei se pune prin examenul microscopic al scaunului proaspăt, între lamă și lamelă, folosind de preferință microscopia în contrast de fază. În scaunele moi, se pot evidenția trofozoiți, iar în cele consistente se pot evidenția chisturi.

3.2.4.1.3.4. Isospora belli și alte peste 70 de specii provoacă, la multe specii de animale și (rareori) la om, o parazitoză (coccidioza). Parazitul este un sporozoar, care se dezvoltă intracelular în celulele mucoasei intestinului subțire. Are, alternativ, un ciclu asexuat (schizogonie) și unul sexuat (sporogonie). Sporozoiții se dezvoltă intracelular, se multiplică, ajungînd la ruperea celulei și la eliberarea de merozoiți. Aceștia pot reinfesta alte celule sau se transformă în macro- și microgametociți (sporogonie), care după împreunare formează un oocist, care dă naștere la 2 sporociști și ciclul reîncepe. Diagnosticul este mai dificil. Se face prin examenul microscopic al scaunului, în care se evidențiază oociști sau sporociști. (La pisică, se poate confunda cu oocistul de Toxoplasma gondii, pisica fiind de cele mai multe ori rezervorul de infestație în toxoplasmoză).

3.2.4.1.3.5. Entamoeba histolytica provoacă amibiaza intestinală (uneori și cu localizări viscerale la distanță). Sînt foarte numeroase specii de amibe, unele libere în natură, altele care trăiesc în intestinul animalelor (reptile, păsări, mamifere, inclusiv omul).

Varietatea și numărul lor este sensibil mai mare în regiunile calde și, mai ales, acolo unde condițiile igienice asigură posibilitatea și masivitatea contaminărilor și a recontaminărilor. Singură *Entamoeba histolytica* este într-adevăr enteropatogenă, putînd produce dizenteria amibiană și complicațiile ei (abcese hepatice, cerebrale, pulmonare etc.). Entamoeba histolytica este o amibă cosmopolită, dar dizenteria amibiană este aproape exclusiv apanajul țărilor calde, deoarece în apariția ei intervin mulți factori, ca: masivitatea și repetarea contaminărilor, alimentația, ecologia bacteriană a intestinului, starea generală a organismului etc.

Entamoeba histolytica, dar și alte amibe neenteropatogene, pot produce, uneori, precedate sau nu de fenomene digestive, abcese cerebrale, cu apariție brutală și cu evoluție de regulă letală.

Diagnosticul amibiazei se face pe date epidemiologice, clinice, anatomopatologice (rectoscopie, biopsie) și parazitologice. Se prelevează,

pentru examen, porţiuni din scaun, care conţin mucus sau/şi sînge. La prelevări prin rectoscopie, se raclează fundul ulceraţiei, iar din abcese (de ex., hepatice) se recoltează ultima porţiune din puroiul aspirat, atunci cînd este colorat cu sînge, sau se prelevează fragmente de ţesut pentru examene histopatologice. Identificarea parazitului este, uneori, dificilă şi cere o tehnică precisă şi bune cunoştinţe parazitologice. Clinicianul conştiincios, dacă foloseşte corect unele tehnici elementare (vezi *2.8.0.0.3.2.* şi fig. 53) poate recunoaşte sau bănui E. histolytica, dar se recomandă insistent, ca diagnosticul prezumtiv să fie confirmat de un parazitolog. Este bine ca, pe lîngă examenul direct al produsului nativ netratat şi tratat cu lugol, să se facă şi preparate fixate şi colorate, care vor fi examinate ulterior de un parazitolog.

Fixarea şi colorarea produsului patologic, în vederea conservării, este deseori delicată şi cere ingrediente de bună calitate. Un preparat care a fost tratat necorespunzător este inutilizabil.

Entamoeba histolytica se prezintă sub 3 aspecte : forma „magna" invazivă, care se găseşte cu precădere la nivelul leziunilor anatomopatologice în formele acute ; forma „minuta", de 10—20 μm, care asigură continuitatea ciclului evolutiv ; forma chistică. Unele caractere ale E. histolytica pot fi recunoscute microscopic pe preparatul proaspăt, examinat la cald, nativ sau tratat cu lugol. Structura mai fină a parazitului se evidenţiază însă numai după o colorare adecvată. Entamoeba histolytica poate fi confundată cu alte amibe intestinale nepatogene, în special cu Entamoeba coli. Ambele au (fig. 79) aprox. aceeaşi dimensiune între 20 şi 25 μm, rareori mai mult pînă la 50 μm. Motilitatea nu poate fi apreciată decît pe preparatul proaspăt şi menţinut la cald. Entamoeba histolytica se mişcă relativ repede într-o direcţie, cu ajutorul unui pseudopod hialin gros, emis brusc. Nucleul nu este de obicei vizibil pe preparatul necolorat, iar pe preparatul colorat cromatina apare fin granulară, răspîndită uniform în nucleu cu un cariosom mic şi compact situat central. Citoplasma este fin granulară, în „sticlă mată", şi se distinge bine ectoplasma clară, de endoplasma fin granulară, cu vacuole mici, care conţin bacterii şi deseori şi eritrocite (ceea ce are mare valoare de diagnostic).

Entamoeba coli are o motilitate lentă, neregulată, cu pseudopode mai mici. Deseori, se poate întrezări, pe preparatul nativ, un nucleu. Cromatina nucleară este aşezată în mase grosolane la periferie. Cariosomul este mare, dar nu compact şi de obicei situat excentric. Citoplasma se diferenţiază greu în ecto- şi endoplasmă şi are vacuole, care conţin bacterii, dar nu conţin niciodată eritrocite.

Chistul de E. histolytica este sferic de 10—20 μm, conţine 1 sau 2, sau (cînd este matur) 4 nuclei, cu cromatina fin granulară la periferie, un cariosom mic, compact, central ; poate conţine corpusculi cromatoidali alungiţi, cu capetele rotunjite ; conţine des glicogen, fie răspîndit difuz, fie în grămezi, care se colorează în roşu-brun cu lugol.

Chistul de E. coli are cam aceeaşi dimensiune (10—35 μm), dar conţine cînd este matur 8 şi, uneori, chiar 16 nuclei, cu cromatină în grămezi mai grosolane. Cariosomul este mare. Poate avea mai rareori corpusculi cromatoidali cu vîrfuri ascuţite (vezi fig. 79).

Scanned with OKEN Scanner

3.2.4.1.3.6. Hartmanella, Acanthamoeba și *Naegleria* sînt amibe care pot provoca *amibiaze cerebrale* (localizare primară fără simptomatologie digestivă). Aceste amibe trăiesc liber în apele stătătoare și pot fi coprofile, dar nu sînt enteropatogene ; ele pot pătrunde prin nas direct în creier, unde să producă abcese foarte greu de diagnosticat și cu evoluție deseori mortală. Diagnosticul etiologic se pune numai prin examenul microscopic parazitologic în preparatul umed al L.C.R. sau al puroiului obținut cu ocazia unei intervenții chirurgicale sau la necropsie. Amibele în cauză pot avea o formă flagelată. Ele sînt ovoide, uneori cu o extremitate ascuțită sau neregulate, de 10—20 μm și sînt mobile și la temperatura camerei.

3.2.4.2. PARAZIȚI (PROTOZOARE) CU LOCALIZARE SISTEMICĂ (FIG. 80)

Parazitozele sistemice se transmit prin artropode hematofage, au un oaspete intermediar obligatoriu și sînt, cu excepția filariilor, proto-

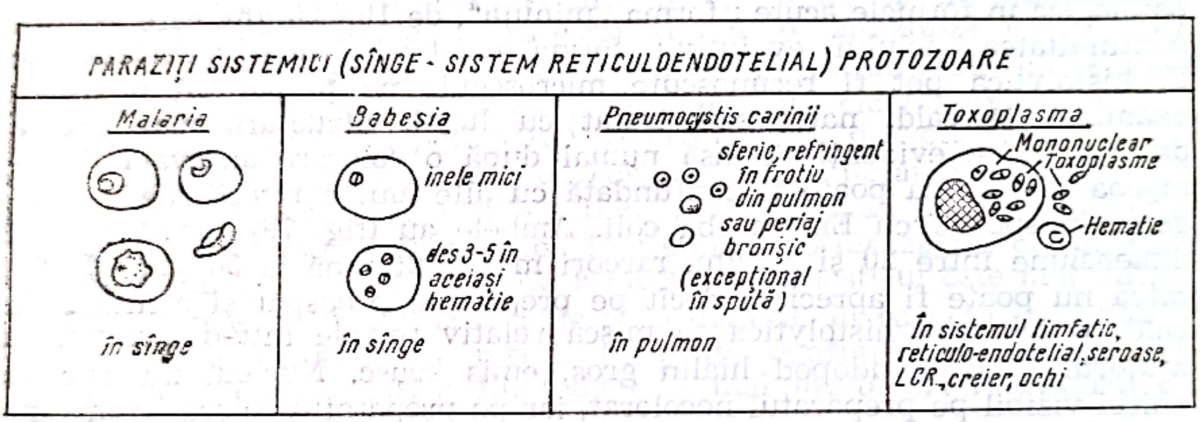


Fig. 80. — Paraziți sistemici. Protozoare.

zoare. Produc boli grave, care — netratate la timp — pot fi deseori mortale. Diagnosticul lor este, deseori, un diagnostic de urgență sau chiar, în suspiciunea de malarie tropică, de extremă urgență.

3.2.4.2.1. Protozoare :

3.2.4.2.1.1. Plasmodium. Se cunosc aprox. 400 de specii de Plasmodium, paraziți ai mamiferelor, păsărilor și reptilelor, dar numai 4 (de obicei doar 3) produc malaria la om, și anume : *Plasmodium vivax* (malaria terță benignă), *Plasmodium malariae* (malaria cvartă) și cea mai periculoasă *Plasmodium falciparum* (tropică sau terță malignă) și, mult mai rar, în anumite arii geografice, *Plasmodium ovale.*

Ciclul evolutiv este practic același și anume boala se contractă prin inocularea de *sporozoiți,* în urma înțepăturii unui țînțar anofel (sînt 400 de specii, care în diferite arii geoclimatice pot transmite malaria). Diseminarea hematogenă a sporozoiților este foarte scurtă, deoarece ei se localizează imediat în celulele parenchimatoase ale ficatului, constituind *faza preeritrocitară* de înmulțire a paraziților, care durează între 7 și 18 zile și care corespunde cu incubația clinică (trata-

mentul preventiv insuficient sau întrerupt prematur suspendă, dar nu vindecă, evoluţia paraziţilor şi accesele pot astfel să apară după mai multe săptămîni de la momentul infestant). După multiplicarea intrahepatică, se revarsă în sînge un număr considerabil de *merozoiţi*, care parazitează eritrocitele, unde se vor înmulţi şi vor constitui *faza (schizogonia) eritrocitară*, caracterizată clinic prin febră, alterarea stării generale şi frisoane. La început (malaria de primoinfecţie), febra este neregulată şi frisoanele nesistematizate. După aprox. 1 săptămînă, accesele se sistematizează şi se repetă la 48 de ore *(P. vivax)*, la 24 sau 48 de ore *(P. falciparum sau P. ovale)* şi la 72 ore *(P. malariae)*. Fiecare criză este determinată de multiplicarea parazitului în eritrocit, ruperea eritrocitului şi eliberarea de tineri *trofozoiţi*, care vor parazita alte eritrocite (fig. 81).

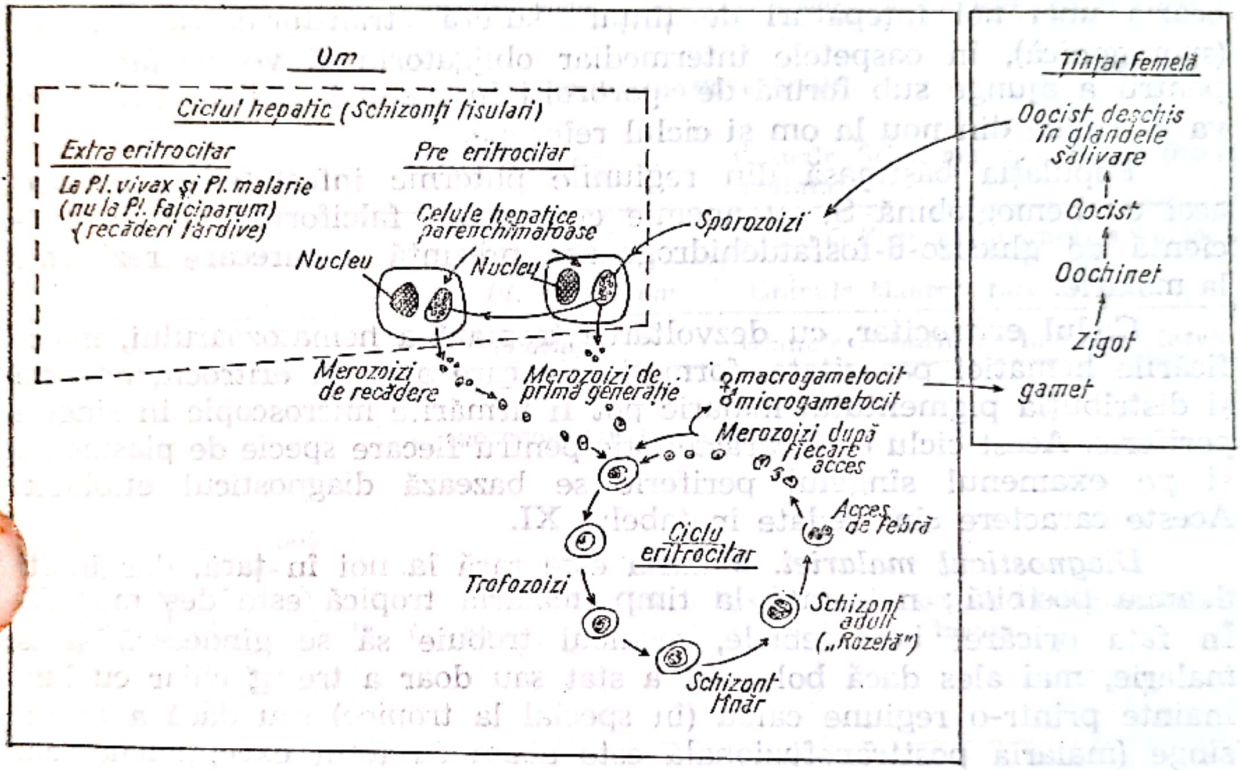


Fig. 81. — Malaria. Ciclul evolutiv.

În perioada de stare, procentul eritrocitelor parazitate poate fi de numai 2/100, pentru P. malariae, dar de 10/100, pentru P. vivax şi P. malariae, şi de 50 şi chiar 80/100, pentru P. falciparum, ceea ce explică în parte gravitatea acestei forme.

La malaria cu P. vivax, P. ovale şi P. malariae (dar nu la cea cu P. falciparum), pe lîngă eritrocite, paraziţii mai pătrund şi în celulele parenchimatoase ale ficatului, unde constituie un al doilea ciclu de evoluţie şi de persistenţă, denumit *faza extraeritrocitară*. Pe lîngă ficat, toate cele 4 specii mai pot parazita splina, celule ale sistemului reticuloendotelial şi măduva osoasă.

Malaria cu P. vivax, P. malariae şi P. ovale, netratată sau insuficient tratată poate duce la cronicitate, care poate dura 2 ani pentru

P. ovale, 5 ani pentru P. vivax și 60 de ani (!) pentru P. malariae. Malaria cu P. falciparum se spune că nu duce la cronicitate, deoarece, dacă nu se vindecă, progresează pînă la moarte.

În ciclul eritrocitar, parazitul se dezvoltă și apoi se divide în 6—24 merozoiți, așezați „în rozetă", care sînt ușor de văzut la microscop. În această fază, P. falciparum are o mare afinitate pentru endoteliul capilarelor viscerale și, din această cauză, nu se observă rozete în sîngele periferic. În schimb, acumularea de paraziți în capilarele viscerale produc o serie de manifestări organice, dintre care cea mai de temut este coma malarică.

După mai multe cicluri schizogonice eritrocitare, se inițiază *gametogenia*, în cadrul căreia o parte din paraziți se diferențiază în macro- și microgametociți (femei și mascul). Aceștia, antrenați cu sîngele, cu ocazia unei noi înțepături de țînțar suferă transformarea sexuată (sporogonică), în oaspetele intermediar obligatoriu și vector (anophel), pentru a ajunge sub formă de sporozoiți în glandele salivare, de unde va pătrunde din nou la om și ciclul reîncepe.

Populația băștinașă din regiunile puternic infestate cu malarie, acei cu hemoglobină S, cu anemie cu hematii falciforme sau cu deficiență de glucozo-6-fosfatdehidrogenază prezintă o oarecare rezistență la malarie.

Ciclul eritrocitar, cu dezvoltarea treptată a hematozoarului, modificările hematiei parazitate, formațiunile care apar în eritrocit, apariția și distribuția pigmentului malaric pot fi urmărite microscopic în sîngele periferic. Acest ciclu este caracteristic pentru fiecare specie de plasmodiu și pe examenul sîngelui periferic se bazează diagnosticul etiologic. Aceste caractere sînt redate în tabelul XI.

Diagnosticul malariei. Malaria este rară la noi în țară, dar întotdeauna posibilă; netratată la timp, malaria tropică este des mortală. În fața oricărei boli febrile, medicul trebuie să se gîndească și la malarie, mai ales dacă bolnavul a stat sau doar a trecut chiar cu luni înainte printr-o regiune caldă (în special la tropice) sau dacă a primit sînge (malaria posttransfuzională este acum cu totul excepțională, dar nu cu desăvîrșire exclusă). Diagnosticul malariei se bazează pe date epidemiologice, anamnestice și clinice și este confirmat neapărat pe punerea în evidență a paraziților în sîngele circulant.

Parazitul malaric mai poate fi evidențiat în măduva osoasă, în ficat, în splină, S.R.E., în capilare viscerale și chiar cultivat în oarecare măsură *in vitro*, dar toate aceste cercetări nu pot fi folosite în munca de rutină și vor fi doar uneori practicate de specialiști.

Cînd se suspectează malaria, recoltarea de sînge se face indiferent de oră și de starea febrilă a bolnavului, în acces sau în afara lui. Recoltarea se repetă cel puțin de 3 sau de mai multe ori din 6 în 6 ore, executîndu-se de fiecare dată cel puțin 3 sau, de preferință, mai multe frotiuri subțiri și tot atîtea picături groase (vezi *2.2.1.0.2.1.*). În unele cazuri se pot face frotiuri și din sedimentul de centrifugă al sîngelui hemolizat (vezi *2.2.1.0.2.3.*)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XI

Malaria (ciclul eritrocitar)

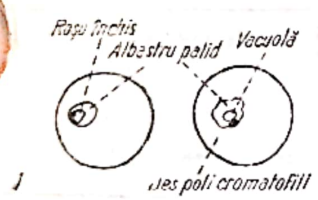
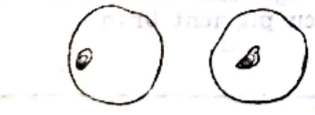
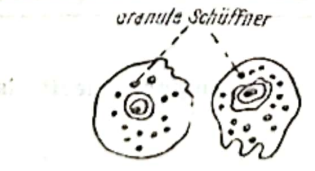
A. ASPECTUL ERITROCITULUI PARAZITAT

1. *Pl. vivax*	Ușor mărit.
2. *Pl. malariae*	Ușor retractat. Normocrom.
3. *Pl. falciparum*	Normal. Normocrom. În eritrocit, 1—2 paraziți. Paraziți cu 1—2 nuclei.
4. *Pl. ovale*	Ușor mărit. Deseori, zdrențuit.

B. GRANULE ROȘII INTRAERITROCITARE

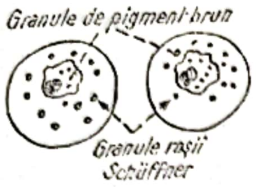
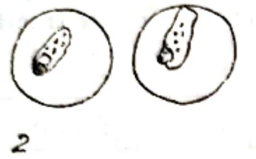
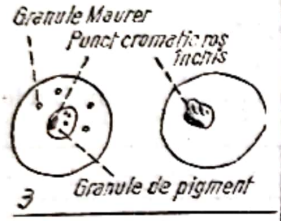
1. *Pl. vivax*	Granule Schüffner, mai des în fazele înaintate
2. *Pl. malariae*	Granule Ziemerman (rare sau deloc).
3. *Pl. falciparum*	Granule Maurer, rare și mari.
4. *Pl. ovale*	Granule Schüffner, în toate fazele

C. TROFOZOID SAU SCHIZONT TÎNĂR

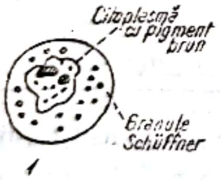
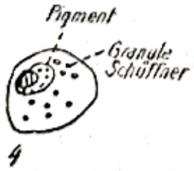
 1	1. *Pl. vivax*	Inel albastru, palid, ocupînd 1/3 din eritrocit. Punct cromatic roșu închis.
 2	2. *Pl. malariae*	Inel albastru, relativ mic, ocupînd 1/6 din eritrocit. Punct cromatic mare. Apare pigment timpuriu.
3	3. *Pl. falciparum*	Inele fine, mici. Punct cromatic mic (deseori două) Uneori, este lipit de marginea eritrocitului.
 4	4. *Pl. ovale*	Inel mare, deseori amiboid.

(continuare tabelul XI)

D. TROFOZOID ÎN CREŞTERE ŞI MATUR

	1. *Pl. vivax*	Inel mare amiboid Vacuolă mare, care dispare Granule brune de pigment Parazitul ocupă 1/3—1/2 din eritrocit
	2. *Pl. malariae*	Parazit de formă rotundă sau în bandă. Granule mari de pigment Parazitul ocupă aproape tot eritrocitul
	3. *Pl. falciparum*	Inele masive Vacuola dispare Granule fine de pigment
	4. *Pl. ovale*	Inelele persistă mult timp, apoi vacuola dispare Pigment brun închis

E. SCHIZONT MATUR PRESEGMENTAT

	1. *Pl. vivax*	Diviziune progresivă de cromatină Citoplasmă cu pigment brun
	2. *Pl. malariae*	Aproape la fel ca la *Pl. vivax*
	3. *Pl. falciparum*	Nu se evidenţiază în sîngele periferic Tropism pentru endoteliul capilar visceral
	4. *Pl. ovale*	Mai mic şi mai compact, decît la *Pl. vivax*

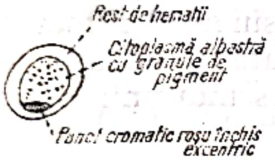
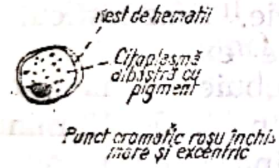
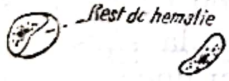
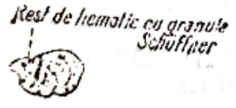
Scanned with OKEN Scanner

(continuare tabelul XI)

F. ROZETĂ

1	1. *Pl. vivax*	Conține 16 (12—24) merozoiți, fiecare cu cromatină și citoplasmă, care umplu eritrocitul Granule difuze de pigment.
2	2. *Pl. malariae*	Conține 8 (6—12) merozoiți, în rozete sau îngrămădiți în eritrocit Pigmentul este grupat central
	3. *Pl. falciparum*	Nu se evidențiază în sîngele periferic
4	4. *Pl. ovale*	Ocupă 3/4 din eritrocit Conține 8—12 merozoizi în rozetă

G. MACROGAMET

 1	1. *Pl. vivax*	Rotund, mare, oval Citoplasma omogenă Cromatină compactă excentrică Granule fine de cromatină
 2	2. *Pl. malariae*	Aproape la fel, ca la *Pl. vivax* Pigment mic vizibil
 3	3. *Pl. falciparum*	Mare, sub formă de „cîrnat" sau ovalar Cromatină centrală, cu pigment în jur Rest de eritrocit, uneori vizibil
 4	4. *Pl. ovale*	Aproape la fel, ca la *Pl. vivax*

H. MICROGAMET

1	1. *Pl. vivax*	Cromatină mare, roșie, cu halou palid Pigment fin difuz

(continuare tabel XI)

2	2. *Pl. malariae*	La fel ca la *Pl. vivax*
3	3. *Pl. falciparum*	Asemănător Cromatina și pigmentul mai difuze
4	4. *Pl. ovale*	Asemănător Cromatina și pigmentul mai difuze

Picătura groasă nu înlocuiește și nu exclude frotiul subțire. Picătura groasă este recomandată teoretic ca analiză de triaj, deoarece permite explorarea unui volum mult mai mare de sînge, dar mai ales dacă preparatul nu este foarte bun și dacă examinatorul nu are mare experiență, se pot face greșeli grosolane, nerecunoscînd unii paraziți (în special, trofozoiți foarte tineri de P. falciparum).

Examenul picăturii groase permite, de regulă, punerea diagnosticului de malarie, dar deseori nu și cel de specie. Diagnosticul de specie, mai ales în cazurile de infecție mixtă (de ex., P. vivax și P. falciparum) se face pe frotiul subțire, care trebuie examinat cu răbdare, mai ales către marginile preparatului, pe cel puțin 5—10 minute înainte de a renunța la cercetare. Viitoarea examinare, cu recoltarea peste 6 și 12 ore, poate fi pozitivă. Sînt deseori mai greu de recunoscut paraziții malariei, dacă sîngele s-a recoltat în acces sau la sfîrșitul lui, cînd trofozoiții sînt foarte mici și uneori alipiți pe marginea unor eritrocite (P. falciparum), decît cu cîteva ore mai tîrziu, cînd paraziții sînt mai mari și mai ușor de recunoscut. Se recomandă ca lamele de sînge să fie reexaminate și confirmate de specialiști, dar în caz de malarie tropică tratamentul trebuie început imediat !

În malaria, care trece la cronicitate, cu lungi perioade afebrile și perioade de accese, recoltările se vor face neapărat (și) în perioadele de accese, dar nu neapărat în plin acces, ci mai degrabă cîteva ore după sau puțin timp înainte (vezi mai sus).

Pentru a recunoaște un parazit malaric, trebuie neapărat să se observe alăturat o formațiune albastră (citoplasma parazitară în formă de inel sau de amibă sau în masă compactă) și una roșie închisă (puncte cromatice) și, deseori, granule maron închis de pigment malaric dispuse central sau periferic în parazit. Modificările eritrocitelor para-

zitate, în special granulațiile Schüffner sau petele Maurer pot și ele uneori atrage atenția.

În laboratoarele de profil, se mai pot utiliza și alte tipuri de analiză, cum ar fi imunfluorescența și testele imunologice.

3.2.4.2.1.2. Babesia (sporozoar) produce babesioza (piroplasmoza), parazitoză a sîngelui. Se transmite prin mușcătura unui ixod. Există foarte multe specii parazite ale reptilelor, păsărilor și mamiferelor, inclusiv ale omului (rareori). Boala produce febră, anemie severă progresivă, icter, hemoglobinurie și moarte. Epizootii mari pot să apară la bovine, ovine, cabaline. La om, apar foarte rare cazuri, care pot fi confundate cu malaria. Paraziții sînt mici (1—3 μm), pleomorfi sau în inel, de multe ori 3—4 paraziți în aceeași hematie (vezi fig. 80). Diagnosticul se pune prin examenul sîngelui, ca și pentru malarie. Datele epidemiologice și clinice pot contribui la stabilirea diagnosticului.

3.2.4.2.1.3. Pneumocystis carinii, agent de clasificare incertă, dar probabil un protozoar, cosmopolit, găsit la animale și la om, de obicei nepatogen, poate produce la nou-născuți, la imundeprimați și în fazele avansate ale unor boli grave, o pneumonie subacută interstițială plasmocelulară gravă, de obicei mortală (pneumocistoza). Nu se cunoaște precis ciclul evolutiv, rezervorul precis de infestație, rezistența în natură și modul de infestare la om (aerogen sau/și digestiv posibil). Parazitul se colorează cu Giemsa, dar mai bine cu colorații speciale și apare ca organisme mici de 1—2 μm, libere, amiboide, rotunde sau în suveică, înconjurate de o membrană. De cele mai multe ori, se poate pune în evidență forma de chisturi de 5—10 μm diametru și cu 8 sporozoiți în interior (vezi fig. 80). Chisturile de 2—4 μm au formă de semilună sau sînt atipice.

Diagnosticul se pune pe amprente sau pe secțiuni din plămîn obținut prin puncție bioptică, deseori postmortem, la examenul histopatologic sau mai rar prin examenul produsului de periaj traheobronșic (eficace, dar periculos) sau încă și mai rar prin examenul sputei.

3.2.4.2.1.4. Toxoplasma gondii este un protozoar, care provoacă o parazitoză cosmopolită (toxoplasmoza). Parazitul poate fi găzduit de foarte multe animale, păsări și mamifere sălbatice și domestice (în special, pisicile), precum și de om. Boala este însă foarte rară la om și apare fie în viața embrionară sau de făt infectat intrauterin, determinînd avort sau sechele congenitale, fie mai rar postnatal, cu manifestări cerebrale, meningiene, oculare, ganglionare, miocardice și încă mai rar ca o boală necaracteristică etc. Există tulpini de Toxoplasma foarte virulente și altele practic total avirulente, care pot fi suportate ani de zile, fără nici o manifestare clinică.

Ciclul evolutiv se poate produce la un singur animal sau prin intermediul unui rezervor și al unui oaspete definitiv (de ex., pisică; pisică-șoarece; pisică-om etc.). El se compune dintr-o fază proliferativă rapidă și una chistică, precum și o fază de multiplicare agamogonică și una gamogonică (sexuată), care dă naștere la sporogonii, și ciclul reîncepe.

Scanned with OKEN Scanner

Trofozoiții măsoară 2—7 μm lungime și 1,5—4 μm lățime, ovoizi sau în semilună, cu o extremitate mai rotundă și una mai ascuțită. Formațiunile chistice pot atinge diametre de 25—100 μm, în interiorul cărora se pot distinge un număr mare de toxoplasme-fiice (vezi fig. 80).

Diagnosticul se poate face prin punerea în evidență a parazitului colorat cu Giemsa în macrofage, în celulele S.R.E., în ganglioni, mai rar în miocard, seroase, L.C.R., intraocular. Imaginea radiologică de mici închistări calcare în creier la nou-născuți, de microcefalie și altele sînt foarte sugestive. Serologia (reacția Sabin-Feldman, fixarea complementului și testul de imunfluorescență) indică infestarea, iar dacă sînt pozitive cu imunglobulinele M, indică o infestare recentă. Avînd în vedere frecvența mare de reacții pozitive, la persoane fără nici un semn de boală, interpretarea reacției pentru confirmarea unei boli la un anume individ trebuie privită cu mult simț critic. Toxoplasma poate fi inoculată la animale de laborator și cultivată pe culturi de celule (de ex., celule HeLa).

3.2.4.2.2. Hemoflagelatele din care fac parte tripanosomele și leishmaniile sînt protozoare, care se pot prezenta (sau transforma) în oaspetele definitiv, în vector sau în culturi, sub mai multe forme (fig. 82).

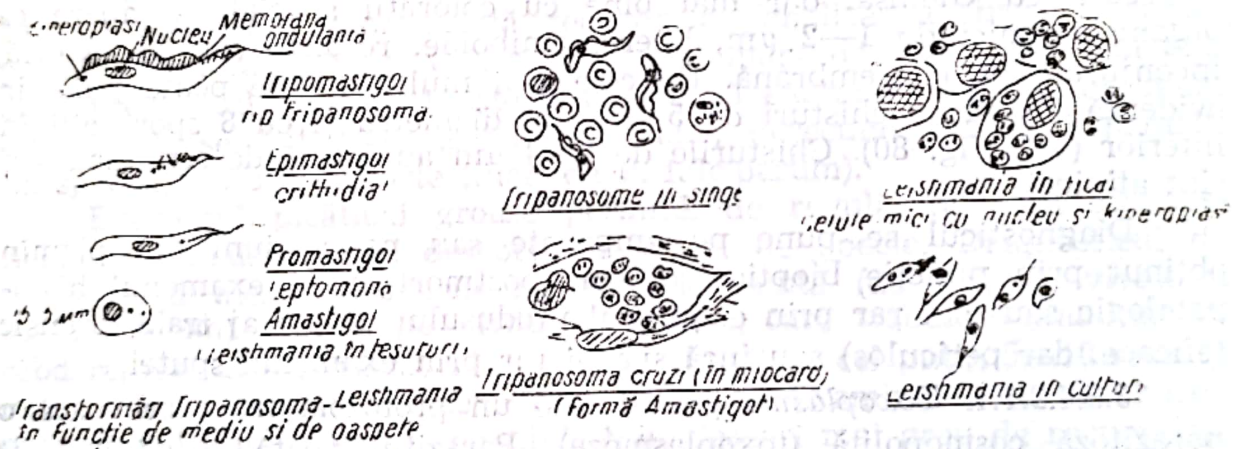


Fig. 82. — Hemoflagelatele.

3.2.4.2.2.1. Trypanosoma gambiense, T. rhodesiense, T. cruzi și alte peste 100 de specii sînt protozoare hemoflagelate, care pot parazita: nevertebrate (insecte), pești, reptile, batracieni, păsări și mamifere de toate felurile. Omul poate fi parazitat numai de 3 specii și anume: *Trypanosoma gambiense*, parazit al omului și al ierbivorelor (vaci, cai, antilope), care constituie rezervorul de infestație, transmise de obicei de artropode hematofage din specia *Glossina palpalis* (musca tse-tse) și care produce boala somnului africană cu evoluție cronică; *Trypanosoma rhodesiense*, transmisă prin specii de *Glossina morsitans*, cu același rezervor de infestație, care produce boala somnului africană cu evoluție rapidă; *Trypanosoma cruzi*, transmisă prin dejecțiile unor specii de plosnițe triatomide, care împreună cu unele mamifere constituie rezervorul de infestație; produce boala Chagas sud-americană.

Trypanosoma gambiense are un corp alungit, ondulat (în C sau în *S*), cu capetele ascuţite, în care se pun în evidenţă prin colorare Giemsa 2 mase cromatice : nucleul şi blefaroplastul, de la care pleacă un flagel, care cu prima parte este alipit de corp, constituind o membrană ondulantă, iar cu extremitatea liberă constituind flagelul propriu-zis (vezi fig. 82). Măsoară 25—28 μm lungime (de 3—4 ori mai lungă decît diametrul unei hematii) şi 1,5—2 μm lăţime. În oaspetele intermediar, parazitul îşi pierde membrana ondulantă şi ciclul este mult mai scurt.

Trypanosoma rhodesiense este foarte asemănătoare, dar ceva mai mică (17—21 μm lungime) şi ceva mai groasă (2—3 μm lăţime). Diagnosticul se pune pe date epidemiologice, anamnestice şi clinice, dar trebuie neapărat confirmat prin evidenţierea parazitului în : sucul tisular de la nivelul procesului inflamator de la locul muşcăturii, recoltat foarte precoce ; ganglionii limfatici, care pot fi tumefiaţi şi bine vizibili ; sînge (aceleaşi tehnici ca pentru malarie, adică frotiu, picătură groasă, sediment din sînge hemolizat) ; L.C.R., în fazele mai înaintate.

Trypanosoma cruzi se prezintă în sîngele bolnavilor în faza acută, sub forma unor tripanosome de 20 μm lungime şi 2 μm grosime, dar în fazele mai înaintate ale bolii, dispar din sînge şi se localizează în diferite ţesuturi (ganglioni limfatici, muşchi, miocard), pierzînd membrana ondulantă şi flagelul liber şi luînd aspectul de leishmanie. În oaspetele intermediar, parazitul suferă de asemenea o serie de transformări intermediare între forma de tripanosomă şi forma de leishmanie. Diagnosticul este deseori dificil, mai ales în formele cronice. Se poate recurge la inoculări la animale de laborator sau la ploşniţe triatomide, dar numai în laboratoare special echipate şi specializate (vezi fig. 82).

3.2.4.2.2.2. Leishmania donovani, L. brasiliensis şi alte numeroase specii sînt protozoare flagelate, care iau forma de leishmanii (fără flagel exterior), în interiorul ţesuturilor la oaspetele definitiv, şi forma de leptomonas, adică cu flagel exterior, la insectele vectoare sau în culturi (vezi fig. 82).

Leishmaniile la om se prezintă sub formă ovoidă de 2—6 μm, cu un nucleu sferic şi un blefaroplast, cu un mic flagel interior. Leishmaniile se fixează şi se înmulţesc în : celulele sitemului reticuloendotelial, ganglioni, măduvă osoasă, splină şi ficat. În afară de om, sînt numeroase animale receptive, care pot constitui rezervorul de infestaţie. Oaspetele intermediar şi vectorul sînt diferite specii de flebotomi.

Leishmania donovani şi 20 de specii înrudite sînt agenţii leishmaniozelor viscerale cu hepatosplenomegalie : kala-azar, cu 4 focare geografice (Asia de Est, bazinul mediteranean, Africa Centrală şi America de Sud).

Leishmania brasiliensis este agentul leishmaniozei cutanate americane. Toate leishmaniile sînt transmise prin flebotomi.

Diagnosticul se pune pe date epidemiologice, clinice şi prin punerea în evidenţă a leishmaniilor în ganglionii limfatici, în ficat sau splină, în interiorul celulelor S.R.E. sau în leziunile cutanate în leishmaniozele cutanate. Rareori, se pot evidenţia leishmanii în monocitele circulante. Se pot obţine hemoculturi şi meduloculturi pozitive pe medii apropriate cu sînge. Testul formolgelului este deseori pozitiv şi poate fi considerat

Scanned with OKEN Scanner

un element de diagnostic (1—2 picături de formol comerț 40/100 de adăugat peste 1—2 ml ser ; dacă se formează un gel în 1—3 ore, care să fie destul de solid pentru a permite răsturnarea eprubetei fără să se scurgă serul, reacția este pozitivă).

3.2.4.3. PARAZIȚI (VIERMI) CU LOCALIZARE NEENTERALĂ

3.2.4.3.1. Filariozele sînt parazitoze produse de viermi subțiri și lungi, care se localizează în sistemul limfatic, unde dau naștere la microfilarii, care invadează în mod intermitent (specii diurne și specii nocturne) torentul circulator. Boala este transmisă printr-un artropod vector, de obicei un țînțar de tip Culex, Anopheles sau Aedes. Citățm doar cîteva specii, mai des întîlnite în țările calde în Africa, în Asia de Sud, în insulele din Pacific.

3.2.4.3.1.1. Wuchereria bancrofti, sub forma unor microfilarii, pătrunde în organismul-gazdă, fiind inoculată de un țînțar parazit (Anopheles, Culex, Aedes). Microfilariile migrează către sistemul limfatic unde se dezvoltă filariile adulte, mascul și femelă, care stau înghemuite în vasele limfatice, unde stînjenesc circulația limfei și pot produce cu timpul un elefantiazis al membrelor inferioare sau al regiunii genitale. Filariile adulte măsoară 5—10 și chiar 20 cm. Ele dau naștere la microfilarii de 300 μm, care migrează noaptea în torentul circulator, de unde pot fi aspirate de un nou țînțar transmițător și ciclul reîncepe (fig. 83).

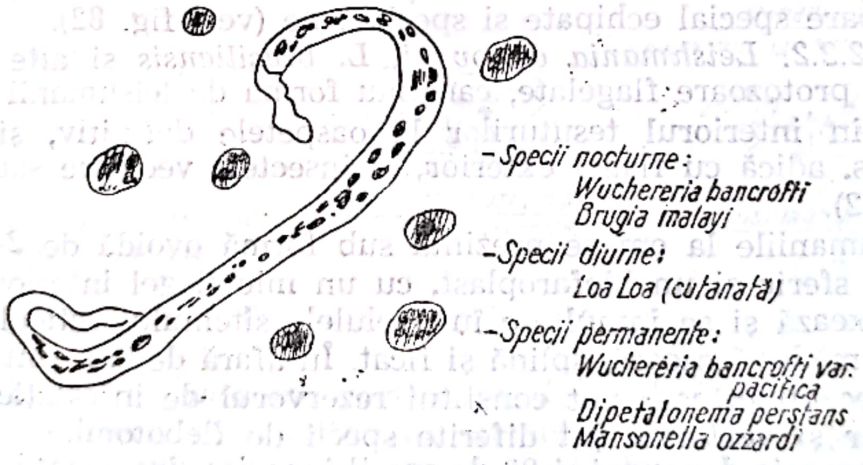


Fig. 83. — Paraziți (nematozi) în sistemul limfatic și în sînge. Microfilaria în picătură groasă (sînge periferic).

Diagnosticul se pune pe criterii epidemiologice, clinice și mai ales prin evidențierea la microscop (obiectiv uscat) a microfilariilor în sîngele periferic, recoltat noaptea, și examinat în preparat proaspăt, în picătură groasă sau în centrifugat de sînge hemolizat (*Wuchereria malayi* poate produce un elefantiazis al membrelor superioare, adenopatii cervicale, și tulburări pulmonare).

Scanned with OKEN Scanner

3.2.4.3.1.2. Onchocerca volvulus se localizează în special în ţesutul subcutanat, producînd noduli scleroşi pe corp şi pe pielea capului şi ochi.

3.2.4.3.1.3. Loa-loa se localizează în ţesutul conjunctiv. Filaria adultă măsoară 4—7 cm şi se deplasează mereu, putînd ajunge subconjunctival şi poate chiar să perforeze ochiul. Microfilariile migrează în sînge în timpul zilei.

3.2.4.3.1.4. Dracunculus medinensis are drept oaspete intermediar şi vector un ciclop din apele stătătoare. Viermele adult măsoară pînă la 2 m şi se localizează în ţesutul subcutanat al membrelor inferioare. Poate fi văzut cu ochiul liber prin transparenţa pielii. Indigenii îl extrag cu băgare de seamă, înfăşurîndu-l pe un beţişor.

Scanned with OKEN Scanner

4. LABORATORUL ȘI TERAPIA ANTIMICROBIANĂ

4.1. NOȚIUNI GENERALE

Singurele infecții, care pot beneficia de o antibiotico- sau chimioterapie, sînt numai acele infecții *bacteriene* sau *parazitare,* ai căror agenți sînt sensibili la acțiunea acestor substanțe. Din această cauză, studiul sensibilității germenilor la antibiotice constituie investigații, uneori utile, deseori necesare sau chiar indispensabile, pentru alegerea și conducerea tratamentului, în unele infecții bacteriene.

Nu trebuie însă să se uite că *vindecarea unei infecții* depinde, pe rînd, de existența și îndeplinirea a 5 etape și anume :

— puterea de apărare a organismului (singurul care intervine în vindecarea virozelor) ;

— așa-numitele „mici îngrijiri", care întotdeauna ameliorează sau asigură buna stare a bolnavului și de care uneori depinde chiar viața bolnavului ;

— existența, buna funcționare sau restabilirea funcțiilor vitale (funcția respiratorie, funcția circulatorie, echilibrul hidroelectrolitic și al homeostaziei etc.) ;

— asanarea chirurgicală sau medicală (sau spontană) a focarelor infecțioase din organism ;

— în ultimul rînd, terapia antiinfecțioasă, care nu are șanse de a fi activă, decît dacă sînt asigurate primele 4 puncte citate mai sus și dacă germenul studiat este patogenul în cauză și dacă este sensibil la medicamentele utilizate.

Ajutorul laboratorului în alegerea, conducerea și controlul terapiei cu antibiotice și cu chimioterapice se evidențiază prin următoarele acțiuni :

— Prima acțiune constă din depistarea de germeni și recunoașterea rolului lor etiologic prin criterii epidemiologice, clinice și microscopice, morfotinctoriale (vezi cap. 3). Aceasta permite, de foarte multe ori, să fie justificată introducerea unui tratament antimicrobian rațional. Germenul patogen odată descoperit și izolat trebuie păstrat neapărat pe toată durata bolii, în cazurile grave, pentru determinări ulterioare.

— A doua acțiune constă din cultivarea agentului etiologic, ceea ce va permite ulterior studiul sensibilității lui la antibiotice și chimioterapice, cu aprecierea concentrației minime inhibitorii (CMI) și bactericide (CMB), față de mai multe antibiotice izolate sau în asociere.

Scanned with OKEN Scanner

Acestea vor contribui (uneori, în mod substanțial) la alegerea tratamentului științific antimicrobian.

— În al treilea rînd, după instituirea tratamentului, se vor putea studia nivelurile de eficiență antimicrobiene inhibitorii (NEI) și bactericide (NEB), în diverse produse și la diverse intervale de timp.

— Rareori, în al patrulea rînd, se cere stabilirea de niveluri de antibiotice obținute la bolnav, precum și în diverse produse și la diverse intervale, ceea ce va contribui la aprecierea unei eventuale nocivități a antibioticoterapiei.

— În al cincilea rînd, laboratorul poate supraveghea și surprinde o modificare a florei microbiene, fie prin înlocuirea unui germen sensibil cu altul rezistent (de ex., coci grampozitivi cu bacili gramnegativi), fie instalarea unei rezistențe (mutaționale sau plasmodiale de contagiune interbacteriană prin factor R).

În clinică, se pot întîlni mai multe situații :

— Întîia, situație foarte frecventă în multe cazuri, este aceea în care istoricul, examenul clinic, paraclinic și examenele sumare orientative de laborator sugerează puternic o boală nebacteriană. În aceste cazuri, fie că se renunță definitiv la tratamentul cu antibiotice, fie se amînă pînă vor exista date suplimentare, care să indice o infecție supraadăugată, cu un germen sensibil la antibiotice, și la care, în plus, tratamentul cu antibiotice prezintă pentru bolnavul în cauză mai multe avantaje decît dezavantaje.

— A doua situație, de asemenea frecventă, mai ales în cazurile bolilor febrile, este aceea în care istoricul, clinica și paraclinica, precum și examenele sumare orientative de laborator, indică una din acele boli sau sindroame infecțioase, la care practica anterioară, datele din literatură și studiile epidemiologice și statistice au arătat că anumite tratamente au mari șanse de a fi utile. Acestea îndreptățesc să se înceapă un tratament, conform unei scheme clasice, chiar dacă va fi modificată pe parcurs, în caz de insucces.

— A treia situație, relativ mai rară, este aceea în care tratamentul cu antibiotice se impune. În aceste cazuri, de multe ori, cele 3 examene morfotinctoriale-cheie (vezi cap. *2.1.3.*) permit să se înceapă un tratament rațional, care eventual, în caz de insucces, va fi reevaluat, în funcție de unele rezultate suplimentare de laborator.

— În sfîrșit, în mai puține situații, și anume în unele stări infecțioase de mare gravitate (septicemii, endocardite, meningite, unele infecții pulmonare și urinare grave și în puține alte cazuri), este necesar să se recurgă la unele analize speciale, pentru determinarea de CMI, CMB, NEI, NEB etc. (vezi *cap. 4.3.*).

Cu cît clinicienii și medicii de laborator clinic sînt mai pricepuți și au o experiență mai mare, cu atît numărul de antibiograme cerute pentru bolnavi și numărul de antibiotice testate în fiecare caz în parte va fi mai mic.

Scanned with OKEN Scanner

4.2. SCOPURI. PRECIZĂRI DE TERMENI. METODE

În antibioticoterapie, clinicianul trebuie să răspundă la 2 întrebări : ce anume antibiotic să utilizeze ? cum să-i aprecieze efectul la bolnavul tratat ?

— *La prima întrebare,* se pot lua în considerare 3 categorii de răspunsuri :

a) *Criteriul clinic,* al rezultatelor obţinute anterior în situaţii similare, este de fapt foarte important, dar plin de necunoscute (ce ar putea fi „situaţii similare" ? altă formă de boală, alţi bolnavi, alţi germeni patogeni sau alte tulpini microbiene etc. ?). La aceasta, se adaugă informaţiile statistice şi epidemiologice, precum şi studiile epidemiologice întreprinse anterior asupra sensibilităţii germenilor de acelaşi fel, la diverse antibiotice (de ex., stafilococii rezistenţi la penicilină etc.).

b) *Criteriul biologic* al acţiunii *in vitro* a diferitelor antibiotice asupra agentului patogen în cauză, precum şi relaţiile dintre concentraţiile de antibiotice şi efectele obţinute, este de fapt scopul principalelor cercetări de laborator.

c) *Criteriile farmacologice* (absorbţie, resorbţie, distribuţie, concentraţii de antibiotic în dinamică şi în diferite ţesuturi, în special în focarul infecţios, eliminare, toleranţă, reacţii adverse şi toxice), în relaţie cu dozele primite, cu vîrsta bolnavului etc., sînt complicate, dificile şi grevate de multe necunoscute, care depăşesc cu mult posibilităţile practice ale clinicianului, nevoit să se sprijine pe datele din literatură. Totuşi, chiar şi în acest domeniu, laboratorul clinic poate fi de folos (vezi mai jos).

— *La întrebarea a doua* se pot da, de asemenea, 3 categorii de răspunsuri :

a) *Criteriul clinic* constă în amendarea fenomenelor morbide.

b) *Criteriul biologic* constă în tendinţa spre normalizare a diferitelor analize (numărătoarea de leucocite, V.S.E., scăderea germenilor din produsele patologice provenite din focare infecţioase etc.).

c) *Criteriul farmacologic* constă în dozarea antibioticelor în sînge sau/şi în alte lichide şi în dovada că s-au obţinut în organism concentraţii superioare acelora active asupra agentului patogen în cauză. De asemenea, dovada că nu s-a depăşit o concentraţie nocivă şi toxică de antibiotic.

Laboratorul clinic poate fi de un real folos în lămurirea unor puncte semnalate mai sus, dar trebuie observat că pe măsură ce ştiinţa şi tehnica progresează, pe măsură ce analiza faptelor merge mai în profunzime, problemele devin din ce în ce mai complexe şi pretenţiile devin mai mari. O tehnică suficientă acum 10—15 ani nu mai este acuma şi, din această cauză, chiar dacă din motive obiective sîntem nevoiţi să ne mulţumim cu o tehnică mai simplă şi de orientare, va trebui în viitor să ne străduim către mai bine.

Fenomenele pricinuite de antibiotic asupra microorganismelor şi asupra macroorganismelor sînt dependente de *concentraţia antibioticelor.*

Scanned with OKEN Scanner

La concentrații crescînde de antibiotic, apar pe rînd, dacă se depășesc anumite valori de *concentrații limită* (sau *critice*), unele tulburări la nivelul microorganismelor tratate (concentrații minime active, dar subinhibitorii) (M.A.C. = Minimal antibacteria concentration), apoi se produce o oprire în multiplicare (concentrație minimă inhibitorie = C.M.I.) sau chiar, pentru unele antibiotice și pentru unii germeni, o omorîre a lor (concentrație minimă bactericidă = C.M.B.). Față de macroorganism, se pot de asemenea distinge concentrații critice nocive și toxice, pentru anumite țesuturi sau pentru tot organismul.

Concentrațiile se exprimă prin raportul ponderal de substanță (de antibiotic) la volumul de solvent (ser, bulion, sînge, L.C.R., urină etc.), practic în micrograme la mililitru (μg/ml).

În limbajul curent, se utilizează des în locul termenului corect de concentrație, expresia (neriguros exactă, dar poate mai sugestivă — imaginativă) de *nivel*, exprimat de asemenea în μg/ml.

Avînd în vedere că, în metoda difuzimetrică (vezi cap. *4.3.1.*), există o relație directă între concentrație și diametrele (∅) zonei de inhibiție, și avînd în vedere că, practic, determinarea concentrației (prin metoda difuzimetrică) se face tocmai pe baza dimensiunii zonei de inhibiție, se folosește des exprimarea *„diametre critice"*, adică acelea care corespund unor concentrații (sau „niveluri") critice.

Pentru a studia efectul asupra unui germen al unor concentrații diferite de antibiotic, trebuie să se obțină, în primul rînd, o scară (sau „gamă") descrescîndă de antibiotic. Pentru aceasta, există 2 metode, și anume : *metoda diluțiilor binare*, cu trepte cu rația 1/2 *, care este mai laborioasă, mai precisă și constituie metoda de referință (vezi *4.3.2.*); *metoda difuzimetrică*, mult mai comodă, dar mai expusă la erori, la care scara concentrațiilor este mult mai abruptă (vezi *4.3.1.*).

4.3. ANTIBIOGRAMA

Prin antibiogramă, se înțelege o metodă relativ simplă, cu ajutorul căreia se poate aprecia sensibilitatea unui germen, față de mai multe antibiotice.

În scopuri clinice, este necesar să se afle rapid, care este sensibilitatea *numai* a acelui germen, care pricinuiește boala, care trebuie tratată, și *numai* față de acele antibiotice, care în cazul respectiv ar putea fi utilizate la bolnav.

Metoda difuzimetrică s-a impus, în practica laboratoarelor clinice și la ora actuală, în multe cazuri, nu ne putem dispensa de ea.

Antibiograma clasică nu poate fi folosită decît pentru germenii aerobi, care cresc repede pe mediul de care dispunem, în condiții obișnuite de incubație (fără CO_2).

Trebuie recunoscut că multe antibiograme executate în unele unități sanitare sînt inutile, din toate punctele de vedere, și chiar induc în eroare și falsifică diferite lucrări statistice, deoarece ele sînt executate cu tehnici nestandardizate, nereproductibile și pe germeni

* Se pot obține, ceva mai complicat, scări cu trepte mai mici.

Scanned with OKEN Scanner

care nu sînt responsabili de boala în cauză, cum ar fi antibiograme „totale" din amestec de salivă cu spută, din materii fecale sau alte produse puternic şi multiplu contaminate, recoltate şi conservate necorespunzător, ceea ce va duce în mod sigur la proliferarea unor germeni saprofiţi şi de contaminare şi la *nesupravieţuirea celor patogeni, care de regulă sînt mult mai puţin rezistenţi.*

Prescrierea antibiogramei trebuie făcută cu bună cunoştinţă de cauză, cu simţ de răspundere şi cu asigurarea că indicaţia, recoltarea, transportul şi conservarea materialului patologic s-au făcut în condiţii bune şi că germenul testat este sigur cel responsabil de infecţia de care suferă bolnavul.

Nici o altă analiză nu este mai des cerută, în mod abuziv, fără nici o justificare logică. Nici o altă analiză nu riscă mai des să determine instituirea unui tratament nepotrivit !

Totuşi, antibiograma, deşi de valoare orientativă, este deseori indispensabilă, dacă este cerută şi executată corect, interpretată cu simţ critic şi dacă nu i se cere mai mult decît poate da.

Plecîndu-se de la premisa (des verificată în practică), că un germen poate fi socotit în clinică ca *sensibil,* la un antibiotic, dacă concentraţia minimă inhibitorie este mult mai mică (de ex., de peste 4 ori), decît concentraţia de antibiotic care poate fi obţinută (şi menţinută un timp minim suficient) la bolnav, şi că trebuie socotit *rezistent,* dacă nu este influenţat nici chiar de concentraţia maximă, care poate fi obţinută la bolnav, s-au stabilit (în mod empiric şi convenţional), pentru fiecare antibiotic în parte, *concentraţiile* (respectiv diametrele zonei de inhibiţie) *critice,* adică acelea care ar permite împărţirea germenilor în „sensibili", „rezistenţi" şi „intermediari" (fig. 84).

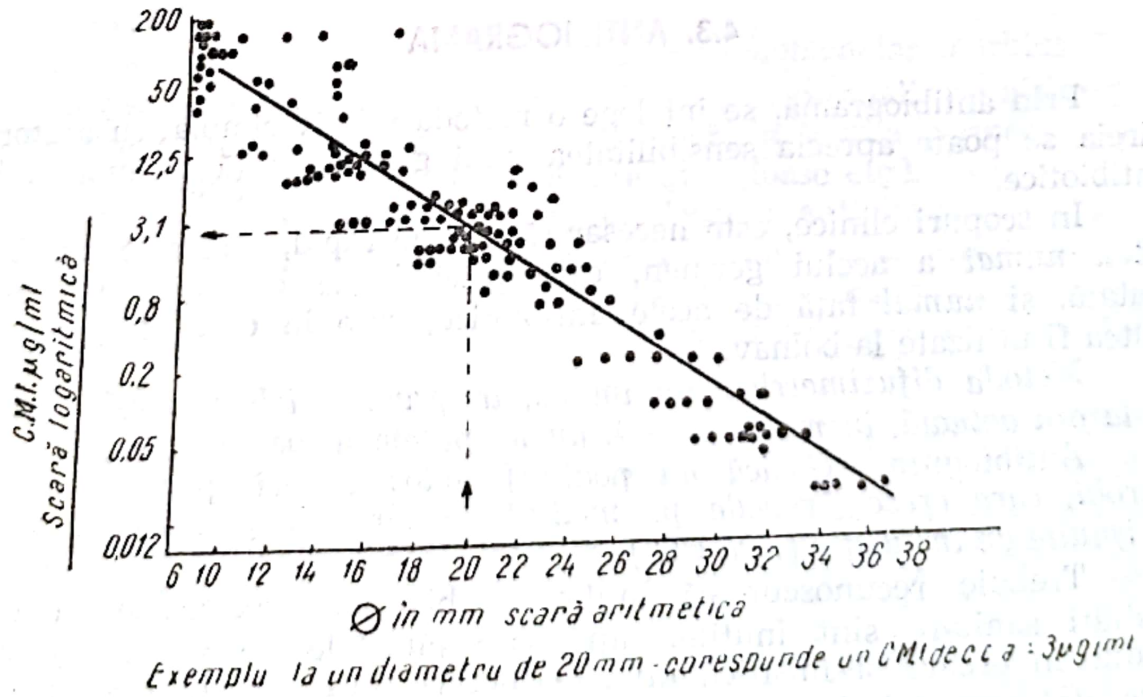


Fig. 84. — Concordanţa între Ø zonei de inhibiţie şi concentraţia minimă inhibitorie (C.M.I.). Exemplu de concordanţă relativ bună. Măsurînd Ø zonei de inhibiţie, se poate afla C.M.I. respectivă (de ex., ampicilină disc de 10 µg).

Mult timp testarea sensibilității germenilor la antibiotice a fost făcută folosind diferite mtode și nenumărate variante. În ultimii 15 ani, s-a impus necesitatea de a se ajunge la o *standardizare a tehnicilor* și la o uniformizare a modului de interpretare și de exprimare a rezultatelor. Cu toate eforturile depuse pe plan internațional, numeroasele propuneri făcute, revizuite, standarde provizorii, mereu îmbunătățite prin colaborări între clinicienii și bacteriologii din multe centre, nu s-a ajuns la un acord privind absolut toate detaliile tehnice. S-a căutat în decursul anilor să se ajungă la o standardizare (convențională și valabilă provizoriu), recurgînd la condiții de lucru din ce în ce mai riguroase, pentru ca rezultatele să fie reproductibile și comparabile.

S-a căutat să se adopte o *clasificare convențională a rezultatelor*, în cîteva categorii, care ar putea fi corelate cu un eventual efect terapeutic în infecții de gravitate medie, folosind doze medii de antibiotice. Această clasificare în categorii, adoptată în mod convențional, este oarecum neprecisă și echivocă. Ea folosește termeni rezultați din practica clinică : *sensibil, rezistent, intermediar*. Acești termeni sînt valabil statistic, pe un număr mare de cazuri, dar nu întotdeauna pentru un anume bolnav.

Antibiograma trebuie interpretată cu simț critic, în cazul individual al unui anume bolnav. Antibiograma nu constituie decît un factor în contextul tuturor celorlalți factori (clinici, statistici, farmacologici etc.), care intervin în indicația, alegerea și conducerea unui tratament antiinfecțios, deși mulți medici naivi și neinițiați, ar considera comod să aleagă pur și simplu antibioticul cu cea mai mare zonă de inhibiție.

4.3.1. METODA DIFUZIMETRICĂ

Principiul. Dacă pe suprafața unei geloze însămînțată uniform cu germenul de cercetat, se plasează într-un punct un disc, care conține o cantitate fixă de antibiotic, acesta din urmă va difuza în geloză, dar concentrația de antibiotic în mediu scade, pe măsură ce se mărește distanța de la punctul de plecare (de la disc), dar nu în raport aritmetic, ci în raport logaritmic. Pentru a obține o zonă de inhibiție dublă, concentrația din disc trebuie să fie de 4 ori mai mare sau ca germenul cercetat să fie de 4 ori mai sensibil.

Germenul însămînțat nu crește în aria în care concentrația de antibiotic depășește concentrația minimă inhibitorie. Aceasta din urmă corespunde cu limita zonei de inhibiție. Aflarea indirectă a concentrației minime inhibitorii se bazează pe premisa că există o relație liniară între dimensiunea zonei de inhibiție și concentrația minimă inhibitorie. Pentru aceasta, s-au determinat pe un număr mare de germeni, în mod concomitent, *dimensiunea zonelor de inhibiție* (în mm), obținută cu discuri cu conținut fix de antibiotic, și *concentrația minimă inhibitorie* (CMI), în μg/ml, determinată prin metoda diluțiilor. Punctele aflate au fost plasate pe o diagramă semilogaritmică, cu diametrul zonelor de inhibiție marcate pe scara aritmetică și concentrația minimă inhibitorie pe scara logaritmică. Curba de regresiune, trasată prin aceste puncte, constituie curba de concordanță între diametrele de inhibiție și CMI-urile care

Scanned with OKEN Scanner

corespund. Folosind aceste diagrame (cîte una pentru fiecare antibiotic), se poate afla (teoretic, dar aproximativ), plecînd de la dimensiunea zonei de inhibiţie, obţinută cu discuri stas, faţă de un oarecare germen, care este CMI respectiv (fig. 85).

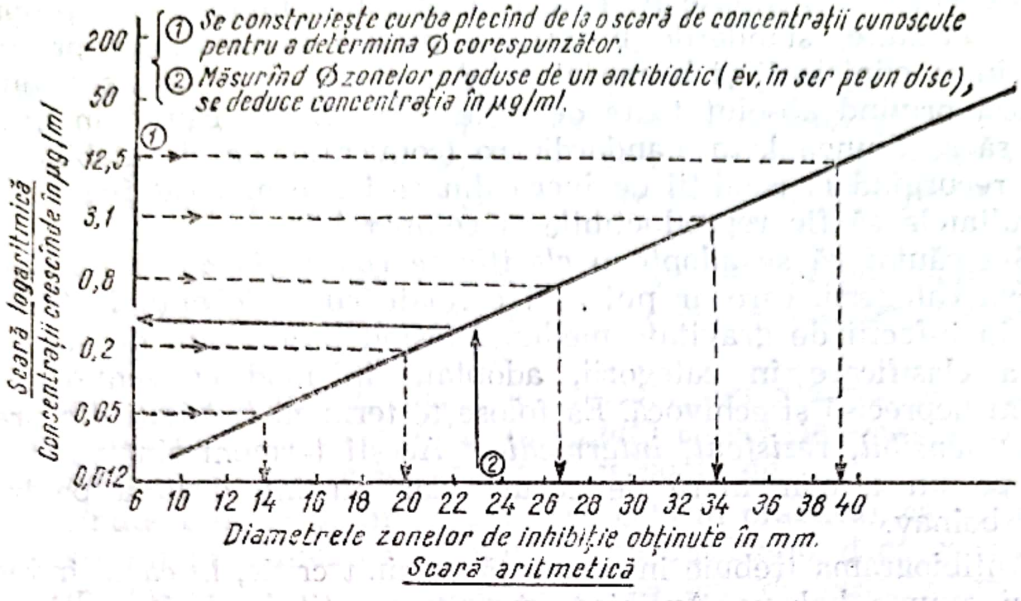


Fig. 85. — Concordanţa între concentraţia de antibiotic în µg/ml (sau per disc) şi ∅ zonei de inhibiţie care se obţine. Se poate face conversiunea : C.M.I. → ∅ şi invers, ∅ → C.M.I. (sau concentraţie în µg/ml).

Invers, cunoscînd diametrul zonei de inhibiţie, obţinut cu discuri de conţinut necunoscut de antibiotic, se poate afla, folosind curba simetrică (în oglindă), care este conţinutul de antibiotic în µg/ml al discului respectiv (fig. 86). Această curbă este folosită atunci cînd se caută să se

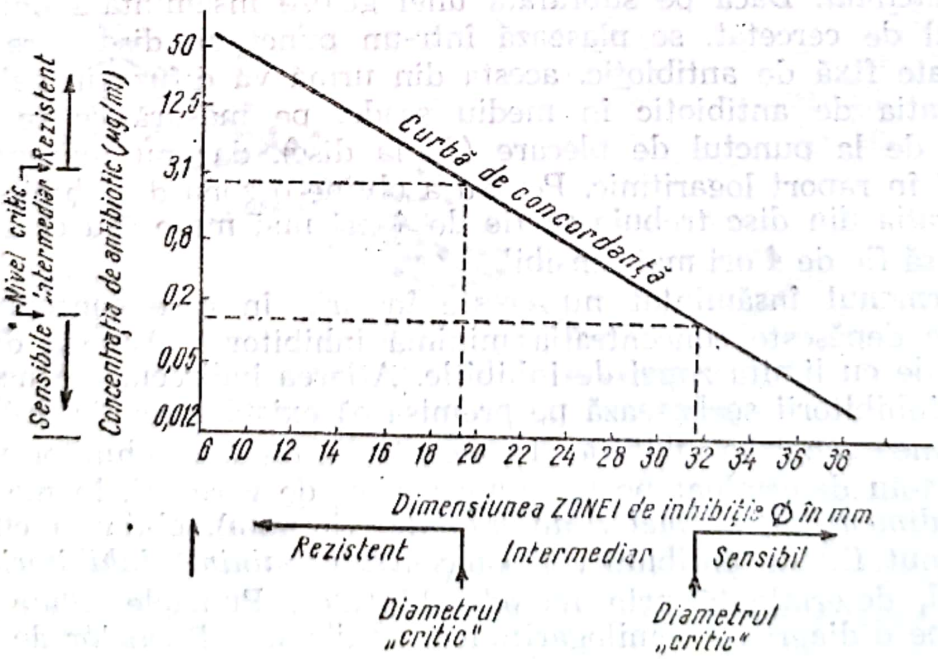


Fig. 86. — Corelaţia între ∅ zonei de inhibiţie şi concentraţie. Împărţirea bacteriilor în categorii : sensibili, intermediari, rezistenţi (de ex., stafilococi faţă de ampicilină).

Scanned with OKEN Scanner

afle concentrația unui antibiotic în ser sau în alt produs, în cursul unui tratament cu antibiotice (vezi *4.3.1.7.*).

Metoda difuzimetrică în suprafață este cea mai ușoară de executat și permite obținerea de informații orientative, chiar semicantitative,

Tabelul XII

Concentrații periculoase de antibiotice

Antibiotic	În ser			În L.C.R.
	Streptomicină	Kanamicină	Gentamicină	Penicilină
Concentrație (medie) periculoasă µg/ml	12—15	30—40	60—70	
Diametre de inhibare (mm) care le corespund cu : Staphylococcus ATCC 25923	7—10	22—28	18—24	28—32
Pseudomonas ATCC 27853			7—10	

Disc de 6 mm Ø de hîrtie sugătoare albă, muiată în ser (L.C.R.) de cercetat. Scurs excesul prin atingerea discului pe marginea eprubetei și aplicat pe suprafața unei geloze Mueller-Hinton, însămînțată cu Staphylococcus ATCC 25923 sau cu Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

asupra sensibilității unui germen, față de mai multe antibiotice (antibiograma „clasică") ; permite obținerea de indicații asupra CMI și CMB, ale unor antibiotice luate separat sau combinate cîte două față de germenul studiat. În cursul unui tratament cu antibiotice, permite obținerea unor informații privind nivelul de eficiență inhibitorie (NEI) și nivelul de eficiență bactericidă (NEB), precum și asupra unui nivel periculos de antibiotice.

Aceste cercetări pot însă fi făcute mai precis prin *metoda directă a diluțiilor* (vezi cap. *4.3.2.*), care folosește tehnici mai pretențioase și la care nu se recurge în clinică decît în puține cazuri grave și speciale (de ex., endocardite, septicemii, meningite etc.).

Tehnica de lucru pentru antibiograma difuzimetrică. Vom descrie, în primul rînd, *tehnica difuzimetrică „oficială"*, adică acea recomandată de O.M.S. și aplicată (mai mult sau mai puțin întocmai) în majoritatea țărilor (S.U.A., sub controlul F.D.A. ; multe țări europene ; recomandată de Ministerul Sănătății din țara noastră din 1977). În continuare, vom expune unele *variante de compromis*, care însă cer un *minimum obligatoriu de control de calitate*, precum și *tehnica îmbunătățită comparativă*.

4.3.1.1. ANTIBIOGRAMA „OFICIALĂ"

Mersul operaţiunilor este reprezentat în figura alăturată (fig. 87).

4.3.1.1.1. Materiale şi ingrediente :

4.3.1.1.1.1. Cutii tip Petri. Acestea trebuie să fie cu fund perfect plan, *rotunde* (90—100 sau 150 mm ∅) sau *pătrate*, cu latura de 150 mm *. Ele vor fi curate şi sterile.

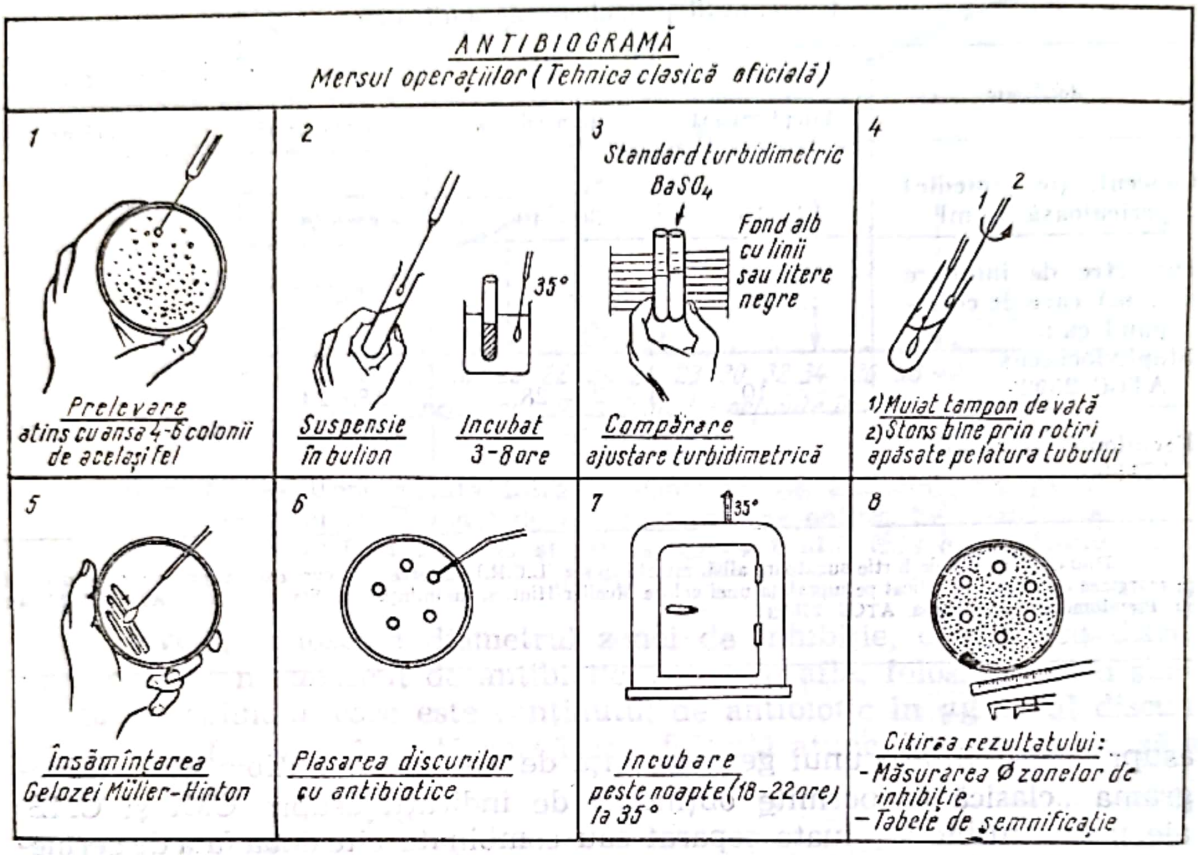


Fig. 87. — Antibiograma. Mersul operaţiunilor. Tehnica clasică oficială.

4.3.1.1.1.2. Mediul de cultură trebuie să aibă calităţi constante, de la un lot la altul. El trebuie să permită creşterea rapidă a majorităţii germenilor de testat, să nu aibă substanţe inhibitoare, nici faţă de unii germeni şi, mai ales, nici faţă de unele substanţe antimicrobiene. Se utilizează, ca fiind mai apropiat de toate aceste condiţii, mediul Mueller-Hinton original, fără glucoză şi cu un pH riguros determinat înainte de utilizare, cuprins între 7,2 şi 7,4. Pentru a-i creşte valoarea nutritivă, pentru unii germeni, mediul poate fi suplimentat cu 5/100 sînge de

* Se pot improviza asemenea cutii, folosind 2 plăci pătrate de sticlă plană (geam), cu latura de 150 mm, separate printr-un cadru făcut dintr-o sîrmă de aluminiu de 4 mm ∅.

Se trasează pe o placă plasată pe un plan perfect orizontal un pătrat cu latura de 120 mm, cu ajutorul unei bucăţi de parafină tare. Se toarnă geloza la mijloc ; ea se va răspîndi pînă la limitele trasate cu parafină. După răcire, însămînţarea şi plasarea discurilor, se pune cadrul şi se acoperă cu a 2-a placă. Plăcile sînt menţinute între ele cu 2—4 benzi de leucoplast.

Scanned with OKEN Scanner

oaie sau cu sînge „şocolată" (geloză-sînge 10/100 încălzită 10 minute la 60°). Pentru cultivarea hemofililor, este necesar să se suplimenteze cu hemină 10 μg/ml (sau geloză-sînge şocolată) (factor X) şi cu 10 μg/ml nicotinamin-adenină dinucleotid (care se află în hidrolizatul de drojdie de bere) (factor V). Pentru a împiedica acţiunea timidinei şi a unor produşi de degradare a acidului folic, care se află în exces în unele şarje cu medii Mueller-Hinton şi care inhibă acţiunea sulfamidelor şi a trimetoprimului, se suplimentează mediul cu 10/100 sînge lacat de cal (fie sînge 20/100 în apă, fie lacat prin îngheţ şi dezgheţ repetat). Mediul nu trebuie să conţină prea mulţi ioni bivalenţi (nu peste 100 mg/l Ca^{++} şi nu peste 3,5 mg/l Mg^{++}), deoarece aceştia inhibă în parte antibioticele aminoglicozide şi tetraciclinele.

Mediul de cultură Mueller-Hinton, de specificat „fără glucoză, pentru antibiograme", poate fi procurat de la Institutul Cantacuzino. El trebuie să aibă un punct de solidificare destul de jos (50°—45°), pentru a permite un eventual adaus de sînge şi o manipulare uşoară la turnare. Trebuie să aibă o consistenţă suficientă, pentru a permite plasarea discurilor în bune condiţii. Se va controla pH-ul înainte de utilizare şi se vor evita fierberi prea repetate sau prelungite.

4.3.1.1.1.3. Germenii martori de referinţă. Deocamdată, pe plan internaţional, se recomandă următorii germeni: *Escherichia coli* A.T.C.C. 25922, *Staphylococcus* A.T.C.C. 25923 şi *Pseudomonas aeruginosa* A.T.C.C. 27853. S-a mai propus, în plus, *Streptococcus faecalis* (enterococ) A.T.C.C. 29212 şi probabil se vor mai introduce şi alţii (de ex., *Klebsiella).* Sensibilitatea acestor germeni la antibiotice, dacă sînt conservaţi în condiţii corespunzătoare, este relativ fixă şi CMI a lor la antibiotice nu trebuie să varieze, la multiple repetări de determinări, cu mai mult de 0,01 μg/ml, pentru penicilină, sau mai mult de 0,1 μg/ml, pentru cefalotină, şi cu cel mult 0,4 μg/ml, pentru carbenicilină. Faţă de celelalte antibiotice, abaterile sînt, în general, sub 0,02—0,05 μg/ml.

Pentru conservarea tulpinilor de referinţă, în condiţii mulţumitoare, trebuie ca tulpinile procurate de la un centru internaţional de referinţă să fie repartizate la diferitele laboratoare cel puţin în dublu, sub formă liofilizată. Din acestea, se vor face subculturi, care se păstrează la rece (la —20° sau, la nevoie, la +4°). În sfîrşit, pentru lucru, se fac subculturi pe geloză înclinată, care pot fi folosite nu mai mult de o săptămînă, pentru *Pseudomonas,* şi 2—3 săptămîni, pentru *Staphylococcus* şi *E. coli.*

Aceşti germeni de referinţă pot fi procuraţi de la Institutul Cantacuzino.

4.3.1.1.1.4. Discurile, impregnate cu cantităţi fixe de antibiotice, au 6,3 mm ∅, aşa cum prevăd recomandările O.M.S. (vezi tabelul XIII). Se folosesc discuri, de preferinţă, de hîrtie sugătoare de 0,8—1 mm grosime, neutră, biologic inactivă şi fără resturi de substanţe, care ar putea influenţa antibioticul sau creşterea diverşilor germeni. Discurile trebuie să fie marcate clar, pe ambele feţe, cu simbolul antibioticului respectiv. Discurile trebuie să conţină o cantitate bine precizată de antibiotic, pe care să o elibereze în mod uniform şi constant.

Scanned with OKEN Scanner

Discurile trebuie conservate la rece în conţinătoare bine închise, la adăpost de umiditate (cu silicagel). Înainte de utilizare, se controlează mai întîi durata lor de valabilitate şi, apoi, discurile se lasă în conţinătoarele lor la temperatura camerei, timp de 20—30 de minute, pentru echilibrarea termică, şi numai apoi vor fi folosite.

La noi în ţară, deocamdată, nu dispunem de discuri corespunzătoare, dar dispunem de microcomprimate de calitate variabilă, al căror conţinut în antibiotice este redat în tabelul XIII, unde sînt arătate aproximativ şi diametrele obţinute pe germenii de referinţă.

4.3.1.1.1.5. Germenul („sălbatic") de cercetat (în privinţa sensibilităţii lui la antibiotice — antibiogramă — în scopul îndrumării tratamentului la un anume bolnav) trebuie neapărat să fie acela care este responsabil de boala în cauză şi faţă de care este de dorit să se instituie un tratament etiotrop. Testarea se face (cu rare excepţii) cît mai curînd după izolare, deseori înainte de precizarea taxonomică, pe cultură pură. Se testează numai germenii aerobi, care cresc repede pe mediul de cultură utilizat, în condiţii obişnuite de incubare (fără CO_2).

Antibiogramele făcute în scop statistic, epidemiologic sau ştiinţific se fac de obicei după identificarea taxonomică şi cu scopul practic de a studia sensibilitatea diverşilor germeni urmăriţi în timp.

În practica spitalicească, în infecţii cu anumiţi germeni (streptococ β-hemolitic grup A, Treponema pallidum, pneumococ, gonococ, meningococ, bacil Koch, bacil tific, hemofili şi alţi cîţiva), se poate institui, la nevoie, de la început un tratament raţional (eventual provizoriu) fără antibiogramă, deoarece procentul de tulpini rezistente este încă mic, la noi în ţară deocamdată, dar el există şi este în uşoară creştere. Epidemiologii au însă sarcina de a urmări sensibilitatea acestor germeni în timp, în diferite regiuni şi în diferite izbucniri epidemice.

În laboratoarele de spital mai slab înzestrate şi încadrate, unde ar trebui să se facă antibiograme numai pentru orientarea tratamentului, se vor limita cercetările numai la germenii aerobi, care cresc repede pe mediile de care dispunem. Germenii care nu îndeplinesc aceste condiţii (de ex., Haemophilus, gonococul, bacilul Koch, anaerobii etc.) vor fi trimişi în laboratoarele mai bine înzestrate sau de profil.

4.3.1.1.1.6. Standardul turbidimetric de sulfat de bariu se obţine, amestecînd 0,5 ml dintr-o soluţie 0,048 mol $BaCl_2$ (care se face dizolvînd 1,175 g $BaCl_2 + 2H_2O$ în 100 ml apă distilată) cu 99,5 ml soluţie 0,8 mol de H_2SO_4 (care se obţine dizolvînd 1 ml H_2SO_4 în 100 ml apă distilată). Soluţia standard turbidimetrică se toarnă într-un tub de sticlă neutră (de ex., 16/160), de acelaşi fel cu tuburile în care se vor face suspensiile microbiene de cercetat. Tubul trebuie bine închis, de preferinţă sudat. Astfel, acest standard poate fi folosit timp de 6 luni, dacă este conservat la întuneric. Standardul turbidimetric trebuie bine agitat, înainte de utilizare (se foloseşte un comparator, iar „citirea" se va face pe fond alb cu dungi sau litere negre).

4.3.1.1.1.7. Riglă cu diviziuni milimetrice sau un *şubler* pentru măsurarea diametrelor zonelor de inhibiţie.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XIII

Controlul prealabil de calitate

al discurilor cu antibiotice (O.M.S. Ø 6,3 mm ; RSR Ø 6 mm) și a mediului de cultură folosit față de tulpini martor de preferință internațională de sensibilitate constantă. Martor E. coli ATCC 25922. Martor Staphylococcus ATCC 25923. Martor Pseudomonas ATCC 27853

Antibiotice sau chimioterapice		µg/disc (U.I./disc)	*Martor E. coli*		*Martor Staphylococcus*		*Martor Pseudomonas*	
			Ø mediu	*Limite tolerate*	*Ø mediu*	*Limite tolerate*	*Ø mediu*	*Limite tolerate*
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amikacină	O.M.S.	10	22,5	19—26	23	20—26	22	18—26
Ampicilină	O.M.S. R.S.R.	10 10	17,5 13	15—20 11—15	29,5 26	24—35 24—28		
Bacitracină	O.M.S.	10 u.i.						
Benzilpenicilină (Penicilina G)	O.M.S. R.S.R.	6 (10 u.i.)			29,5 30	26—37 28—35		
Carbenicilină	O.M.S. R.S.R.	100 100	26,5 25	24—29 23—29			22 22	20—24 19—25
Cefalotină	O.M.S. R.S.R.	30 (30)	20,5 16	18—23 13—20	31 30	25—37 28—32		
Cloramfenicol	O.M.S. R.S.R.	30 50	24 19	21—27 18—21	22,5 20	19—26 18—22		6
Clindamicină	O.M.S.	2 u.i.			26	23—29		
Colistină	O.M.S. R.S.R.	300 u.i. 300	13 16	11—15 15—19			14 13	12—16 11—15
Cotrimoxazol	O.M.S. R.S.R.	25 25	28 25	24—32 23—26	28	24—32		
Eritromicină	O.M.S. R.S.R.	15 15	11	8—14	26 23	22—30 21—26		
Gentamicină	O.M.S. R.S.R.	10 (10 și 30)	22,5 19	19—26 17—21	23 22	19—27 18—25	18,5 19	16—21 16—22
Kanamicină	O.M.S. R.S.R.	30 30	22,5 18	19—26 16—20	21 21	17—25 18—23		6
Lincomicină	O.M.S. R.S.R.	12			23	20—27		
Meticilină	O.M.S.	5			19,5	17—22		

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Metronidazol	R.S.R.	10 şi 30						
Nalidixic acid	O.M.S. R.S.R.	30 40	23 19	21—25 18—22				
Neomicină	O.M.S.	30 u.i. 30	18	17—19	20	18—22		
Novobiocină	O.M.S.	30 u.i. 10			20	18—22		
Nitrofurantoină	O.M.S. R.S.R.	300 10 (200)	22 10	20—24 10—12				
Furazolidonă	R.S.R.	30	18	16—20				
Oxacilină	O.M.S. R.S.R.	1 5	21	18—23				
Polimixină	O.M.S. R.S.R.	300 u.i. 30	16	14—17				
Streptomicină	O.M.S. R.S.R.	10 50	16 18	12—20 16—20	18 20	14—22 17—23		
Sulfamidă (Sulfizoxazol)	O.M.S. R.S.R.	300 30 şi 1 000	24,5 12	23—26 10—15	25	23—27		6
Tetraciclină	O.M.S. R.S.R.	30 50	21,5 20	18—25 19—23	23,5 24	19—28 20—28		
Tobramicină	O.M.S.	10	22	15—26	24	19—29	22	19—25
Vancomicină	O.M.S.	30 u.i.						
Rifampicină	O.M.S. R.S.R.	5 6			25	23—28		

N.B. Discurile care nu satisfac valorile limite admise, nu vor fi utilizate.

4.3.1.1.2. Mersul operaţiilor :

— Se plasează cutiile Petri pe un plan *perfect plan şi orizontal* (controlat cu o nivelă), de preferinţă într-o nişă cu ultraviolete.

— Se topeşte geloza Mueller-Hinton la bain-marie, evitînd o încălzire prea prelungită sau topiri repetate.

— Mediul topit şi răcit la 50—60° (suplimentat, dacă este cazul, cu sînge de oaie sau cu sînge lacat de cal) este turnat în cutiile Petri, într-o grosime de 4 mm (25 ml mediu, pentru cutii Petri de 90—100 mm ∅ ; 60 ml, pentru cutiile de 150 mm ∅).

Cutiile cu mediu pot fi folosite în aceeaşi zi sau după o păstrare de aproape 1 săptămînă la +4°C.

— Înainte de utilizare, cutiile sînt lăsate (eventual la termostat) cu capacul întredeschis, pentru evaporarea apei de condensare.

Scanned with OKEN Scanner

— Pregătirea suspensiilor microbiene se face separat, pentru fiecare germen de referinţă şi pentru fiecare germen „sălbatec" de cercetat. În practică, se însămînţează, în mod sărac, cîte 3—5 ml bulion (tripticase-soia sau Columbia sau alt bulion de bună calitate), cu fiecare din germenii de referinţă, şi alţi 3—5 ml de bulion, cu o suspensie omogenă, obţinută din 5—10 colonii de acelaşi fel, crescute pe un mediu neselectiv din germenul de cercetat. Suspensiile microbiene sînt lăsate să se dezvolte — eventual agitate — la 35°, timp de 3—6 ore, pînă se observă o uşoară tulbureală, după care vor fi ajustate turbidimetric (fie prin diluţie, fie prin prelungirea perioadei de incubare), faţă de standardul de sulfat de bariu.

Astfel, suspensiile microbiene conţin germeni, care se află toţi în aceeaşi fază de creştere, şi anume în faza de multiplicare logaritmică. Suspensiile microbiene, odată ajustate, se folosesc în decurs de 15 minute.

— *Însămînţarea* se face cu „tamponul ud". Un tampon de vată neutră este înmuiat în suspensia microbiană, apoi stors bine prin rotirea lui apăsată pe peretele interior al tubului cu suspensie şi apoi se însămînţează suprafaţa mediului, prin plimbarea tamponului cu regularitate pe toată suprafaţa mediului ; se repetă apoi operaţia, în continuare, încă în două direcţii şi se termină prin rotirea tamponului de-a lungul marginilor cutiei.

Însămînţarea mai poate fi făcută *prin înec* ; apoi se aspiră excesul. Tehnica este bună, ceva mai înceată şi nu se poate aplica în tehnica comparativă (vezi *4.3.1.6.*).

Teoretic, trebuie să se obţină „colonii aproape, dar nu de tot confluente".

După însămînţare, cutiile sînt lăsate să se usuce, cu capacul întredeschis (mai ales dacă însămînţarea s-a făcut prin înecare), timp de 10—20 de minute, dar nu mai mult (nu cu preincubare), după care se plasează discurile cu antibiotic.

— *Plasarea discurilor cu antibiotic* se face pe suprafaţa însămînţată şi uscată (dar nu după mai mult de 10—20 de minute de la însămînţare). Se foloseşte o pensă fină („de iris") sau un dispozitiv mecanic *, care plasează în acelaşi timp 6 sau mai multe discuri, fiecare fie în linie dreaptă, fie în cerc. Distanţa dintre discuri trebuie să fie de cel puţin 30 mm şi de 15 mm de la disc la marginea cutiei.

După plasare, discurile sînt uşor presate pe suprafaţa gelozei.

După plasarea discurilor, cutiile Petri mai pot aştepta 10—15 minute, la temperatura camerei (dar nu mai mult, nu cu predifuziune), după care sînt plasate cu faţa în jos, la termostat la 35° (pentru stafilococii eterorezistenţi şi producători eventual de β-lactamază, se recomandă o însămînţare mai abundentă ; o suplimentare a mediului cu NaCl 5% sau/şi o incubare la 30°, ceea ce permite o mai bună diferenţiere a acestora).

* Pentru a putea fi folosite în dispozitivele mecanice, mai sus amintite, trebuie ca discurile să fie livrate în fişic, în cartuşe speciale.

Scanned with OKEN Scanner

4.3.1.2. ALEGEREA ANTIBIOTICELOR PENTRU ANTIBIOGRAMA DIFUZIMETRICĂ

În practică, se recomandă limitarea antibioticelor de cercetat la strictul necesar, deoarece nu se pot testa toate antibioticele existente, al căror număr depăşeşte cu mult o sută, şi nici chiar cîte un reprezentant al fiecărei familii sau „rude" de antibiotice. Pentru studii epidemiologice şi statistice, se pot folosi eventual 2 seturi, unul pentru germenii grampozitivi şi altul pentru cei gramnegativi, care totuşi pot cuprinde pînă la 15—18 antibiotice fiecare ! În practică, cînd se execută o antibiogramă, pentru orientarea tratamentului la un bolnav anumit, numărul antibioticelor de testat poate fi redus foarte mult, de obicei sub 6, deseori chiar la mai puţin. În limitarea antibioticelor de cercetat, clinicianul, împreună cu medicul de laborator, se vor baza pe felul bolii, pe contextul epidemiologic al cazului, pe localizarea infecţiei, pe produsul din care s-a izolat germenul, pe experienţa anterioară în cazuri similare, pe aspectul macroscopic al coloniilor microbiene de cercetat, pe aspectul microscopic morfotinctorial al germenului şi pe caracterele farmacologice complexe ale antibioticelor, eventual utile. Bineînţeles, trebuie să se mai ţină seama de ce fel de antibiotice putem dispune şi de preţul lor de cost. Din aceste motive, nu se pot utiliza, de obicei, seturi absolut fixe*, cu anumite antibiotice în situaţiile mai des întîlnite, cum ar fi pentru coci grampozitivi, în grămezi sau în lanţuri, sau pentru coci gramnegativi, bacili grampozitivi, bacili gramnegativi din infecţii sistemice, urinare, digestive etc.

În privinţa discurilor cu antibiotic, se recomandă deocamdată următoarele (lista va putea fi lărgită, în funcţie de situaţia existentă) :

— *Ampicilina* (utilizată şi pentru amoxicilină). Hemofilii sensibili la ampicilină, dar rezistenţi la benzilpenicilină, trebuie consideraţi rezistenţi şi la ampicilină.

— *Benzilpenicilina* sau *penicilina G* (utilizată şi pentru penicilina V).

— *Cefalotina* (utilizată pentru toate cefalosporinelor, cu excepţia cefoxitinei, care va putea fi introdusă în curînd).

— *Carbenicilina* (utilizată şi pentru carindacilină şi uticilină ; ticarcilina în locul carbenicilinei).

— *Meticilina* sau *oxacilina* (utilizată pentru toate penicilinele rezistente la penicilinaza stafilococului : cloxacilină, nafcilină etc. şi pentru a verifica sensibilitatea stafilococilor sensibili la cefalotină).

— *Streptomicina, kanamicina* (utilizată şi pentru neomicină), *gentamicina (tobramicina, amikacina).*

---

* Propunerea făcută de mine în 1976 avea numai o valoare orientativă, valabilă atunci, în condiţiile obişnuite ale serviciului respectiv. Trebuie să semnalăm că limitele critice între sensibil, intermediar şi rezistent erau cevaprea joase.

Scanned with OKEN Scanner

— *Cloramfenicol.*

— *Tetraciclina* (utilizată pentru toate tetraciclinele ; *minociclina* are un spectru diferit în parte : germenii rezistenţi la minociclină sînt rezistenţi şi la tetraciclină, dar nu şi invers).

— *Novobiocina* * (valabilă numai în medii fără sînge).

— *Colistina* sau *polimixina B* (au acelaşi spectru).

— *Eritromicina* (utilizată şi pentru celelalte macrolide = spiramicina, oleandomicina etc.).

— *Lincomicina, clindamicina* (ar fi de dorit să se introducă).

— *Rifampicina.*

— *Sulfizoxazolul* sau *sulfafurazolul* (Neoxazol), utilizat pentru toate sulfamidele (în special în infecţii urinare).

— *Nitrofurantoina* (în infecţii urinare).

— *Furazolidona* (în infecţii digestive).

— *Acidul nalidixic* (Negram, Nevigramon ; utilizat şi pentru acidul oxolinic ; în infecţii urinare, excepţional în infecţii digestive).

— *Cotrimoxazolul* (trimetoprim + sulfamethoxazol ; Septrin, Biseptol etc.).

— *Metronidazolul* (activ asupra bacililor gramnegativi anaerobi).

4.3.1.3. INCUBAREA, CITIREA ŞI INTERPRETAREA REZULTATELOR, CAUZE DE EROARE

Incubarea se face fără CO_2, aerob, la 35°, iar o primă citire de orientare, în cazuri urgente, se poate face de îndată ce creşterea germenilor devine vizibilă cu ochiul liber, adică după 6—8 ore de incubare (chiar mai devreme, dacă mediul este suplimentat cu sînge). Citirea definitivă se face la 18—20 de ore.

Se măsoară cu grijă, în primul rînd, *diametrul zonelor de inhibiţie* (inclusiv diametrul discului cu antibiotic), produs de diferitele antibiotice faţă de germenii de referinţă (martorii zilei respective = M). Se notează regulat, în caietul de lucru, martorul zilei, pentru fiecare antibiotic cercetat, faţă de germenii de referinţă. Aceasta constituie aşa-numitul *control de calitate* al mediului de cultură şi al lotului de discuri de antibiotic folosite (dar nu al discului individual plasat pe germenii sălbatici de cercetat). Diametrele obţinute cu diferitele discuri cu antibiotic trebuie să producă la germenii de referinţă zone de inhibiţie, cuprinse între limitele de toleranţă admise şi specificate în tabelul XIII.

În continuare, se măsoară cu grijă diametrele zonelor de inhibiţie, obţinute cu fiecare disc cu antibiotic, faţă de germenul de cercetat.

---

* Este scoasă din Nomenclatorul de medicamente din tara noastră.

Scanned with OKEN Scanner

Citirea se face cu ochiul liber, fie prin examinarea antibiogramei prin transparenţă, fie (mai bine) folosind o iluminaţie tangenţială, pe fond negru (fig. 88).

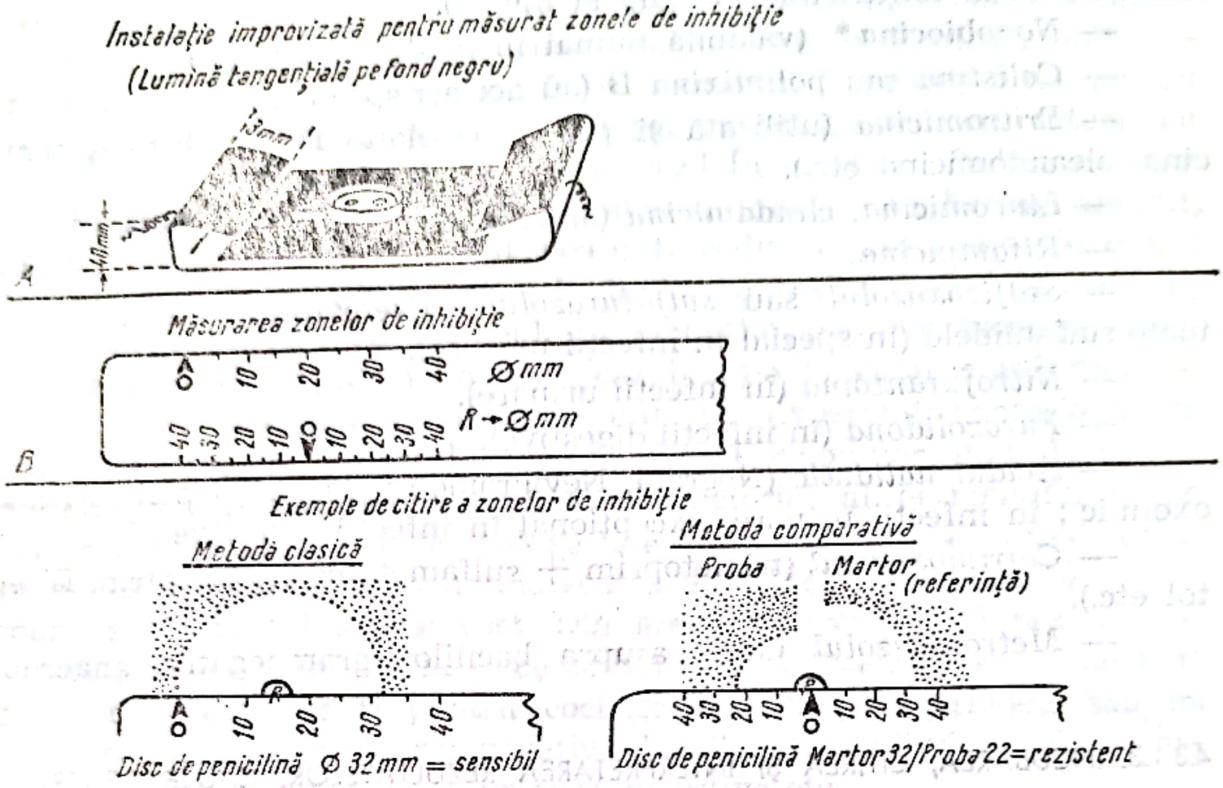


Fig. 88. — Antibiograma. Măsurarea zonelor de inhibiţie.
A — Tablă de aluminiu de cca 300/200 mm, îndoită la capete, pentru a masca 2 becuri electrice. Se vopseşte pe deasupra în *negru mat*. Se aşază o riglă gradată sub cutia Petri cu antibiogramă. *B* — Riglă obişnuită (în mm), gradaţie pentru convertirea razei în diametru

Măsurarea zonei de inhibiţie se face cu o riglă aşezată sub fundul cutiei Petri, avînd însă grijă ca citirea să se facă riguros perpendicular pe limitele zonei de inhibiţie, evitînd astfel greşeli de paralaxă. Se mai poate măsura dimensiunea zonei de inhibiţie cu un şubler. Se controlează dacă zona de inhibiţie este perfect rotundă, măsurînd diametrul zonei în 2—3 direcţii.

Interpretarea rezultatelor se face în funcţie de dimensiunea zonelor de inhibiţie, conform indicaţiilor din tabelul XIV, exprimînd rezultatul cu termenii de *sensibil, rezistent* sau *intermediar,* cu condiţia ca diametrele zonelor de inhibiţie de la „controlul de calitate“ să cadă în limitele de toleranţă admise.

În cercetări statistice şi epidemiologice, se recomandă să se exprime rezultatul doar în termenii de „rezistent“ şi „sensibil“, incluzînd în prima categorie şi pe cei „intermediari“.

O greşeală frecventă şi des gravă se face, atunci cînd se folosesc aceleaşi criterii de interpretare (aceleaşi dimensiuni critice ale zonelor de inhibiţie). valabile şi verificate pentru o metodă (de ex., cea recomandată de O.M.S., F.D.A. şi Ministerul Sănătăţii din R.S.R. din 1977), şi atunci *cînd se lucrează cu altfel de discuri* (eventual cu alte concentraţii de antibiotic, uneori improvizate şi necontrolate), cu alte medii de

cultură și în alte condiții de lucru, fără să se facă totodată unele lucrări de control (vezi mai departe).

Se ia în considerare diametrul zonelor de inhibiție (adică zona lipsită de colonii microbiene vizibile cu ochiul liber), inclusiv diametrul discului cu antibiotic, fără a lua în considerare coloniile foarte mici, vizibile doar cu lupa sau invazia ulterioară a zonei de inhibiție, prin extinderea în suprafață produsă de Proteus, și nici o creștere mai discretă în interiorul zonei de inhibiție, care se produce deseori în cazul discurilor cu sulfamidă sau cu cotrimoxazol. Dacă limita zonei de inhibiție nu este foarte bine precizată, cum se întîmplă nu rareori cu discurile cu cloramfenicol și cu cele cu tetraciclină, se ia în considerare diametrul zonei total lipsită de colonii.

Situații speciale privind apariția de colonii la marginea sau în interiorul zonei de inhibiție. Acestea se pot datora mai multor cauze :

— Cultură mixtă, cu o populație microbiană eterogenă sau cultură suprainfectată, care se poate produce cînd se lucrează direct cu un produs patologic (antibiogramă totală — total contraindicată !). Ea se recunoaște, de obicei, relativ ușor, prin caracterele morfologice, culturale și morfotinctoriale microscopice ale germenilor din exteriorul și din interiorul zonei de inhibiție (fig. 89).

— Cultură pură, dar cu germeni de sensibilitate diferită. Această situație poate fi întîlnită mai des pe culturi primare, pe care se însămînțează un număr mare de germeni de aceeași specie, dar în diferite faze de multiplicare sau de latență, și mult mai rar pe culturi secundare, plecate de la numai 5—10 colonii de același fel. La stafilococii eterorezistenți, zona de inhibiție este mai mică, marginile zonei sînt net delimitate, dar cu colonii dezvoltate bine, care încalecă marginea sau apar către periferia zonei de inhibiție (fig. 89).

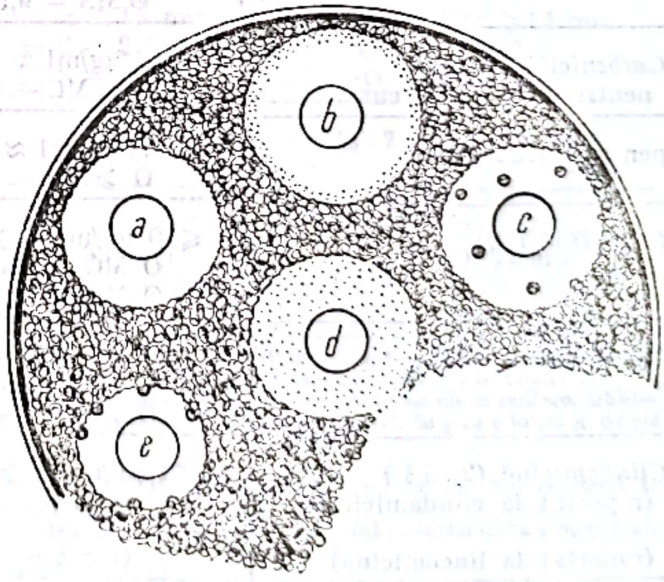


Fig. 89. — Antibiograma. Aspectul limitelor zonelor de inhibiție : *a* — limită precisă ; *b* — limită cu zonă de inhibiție intermediară (mai des la bacteriostatice) ; *c* — colonii izolate în zona de inhibiție (mai des la antibiograme pe culturi primare) : mutante rezistente ; contaminare săracă cu alt germen rezistent (existență de germeni restanți, care se multiplică după difuzarea antibioticului) ; *d* — invazie secundară a zonei de inhibiție (de ex., cu Proteus) sau inhibiție parțială (de ex., sulfamide) ; *e* — colonii mari la marginea zonei (deseori, la stafilococi eterorezistenți).

— Coloniile care apar în mijlocul zonei de inhibiție pot fi datorate fie unei mutante rezistente, fie unor germeni cu factor plasmodial de rezistență, fie dezvoltării mai tardive (după ce antibioticul s-a diluat

Tabelul XIV

Antibiograma

Criterii de interpretare (mod de exprimare) a rezultatelor

Împărţirea pe categorii (sensibil, intermediar, rezistent), delimitate de concentraţii critice în µg/ml ≈ „diametre critice" în mm. În metoda comparativă, se va raporta rezultatul în mod flexibil, în raport cu dimensiunea zonelor de inhibiţie, obţinute pentru fiecare antibiotic, faţă de germenii martori de referinţă internaţională şi anume: martor *E. coli* ATTC 25922 (MC), martor *Staphylococcus* ATCC 25923 (MS) martor *Pseudomonas* ATCC 27853 (MP)

Antibiotic (concentraţie per disc în µg)	*Sensibil* Concentraţie ≈ Diametru critică în µg/ml critic în mm	*Rezistent* Concentraţie ≈ Diametru critică în µg/ml critic în mm
Amikacină (10)	⩽ 4 µg/ml ≈ ⩾ 14 mm Ø MC — 8 mm Ø MS — 8 mm	⩾ 16 µg/ml ≈ ⩽ 10 mm Ø ⩽ MC — 12 mm Ø⩽ MS — 12 mm
Ampicilină (10) — pentru gramnegativi şi enterococi	⩽ 8—10µg/ml ≈ ⩾ 14 mm Ø ⩾ MC — 3,5 mm Ø ⩾ MS — 5 mm	⩾ 32 µg/ml ≈ ⩽ 10 mm Ø ⩽ MC — 7,5 mm Ø ⩽ MS — 19,5 mm
— pentru stafilococi şi bacterii sensibile la Penicilina G	⩽ 0,2 µg/ml ≈ ⩾ 29 mm Ø ⩾MS — 0,5 mm	⩾ 2 µg/ml ≈ ⩽20 mm Ø ⩽MS — 2 mm
— pentru hemofili	⩽0,5 µg/ml ≈ ⩾20 mm Ø ⩾MC — 2 mm	⩾2—4 µg/ml ≈ ⩽19 mm Ø⩽ MC — 2,5 mm
Benzilpenicilină (G) pentru stafilococi	⩽ 0,1 µg/ml ≈ ⩾29 mm Ø ⩾MS — 2,5 mm	⩾0,5 µg/ml ≈ ⩽20 mm Ø ⩽MS — 11,5 mm
pentru alţi germeni	⩽1,5 µg/ml ≈ ⩾22 mm Ø MS — 9,5 mm	⩾32 µg/ml ≈ ⩽11 mm Ø ⩽MS — 20 mm
Carbenicilină (100) pentru coli şi Proteus	⩽16 µg/ml ≈ ⩾23 mm Ø ⩾MC — 3 mm	⩾32 µg/ml ≈ ⩽17 mm Ø MC — 9 mm
pentru Pseudomonas	⩽12,5 µg/ml ≈ ⩾17 mm Ø ⩾MP — 4 mm	⩾250 µg/ml ≈ ⩽13 mm Ø ⩽MP — 9 mm
Cefalotină (30)	⩽10 µg/ml ≈ ⩾18 mm Ø MC — 2,5 mm Ø MS — 13 mm	⩽32 µg/ml ≈ ⩽14 mm Ø ⩽MC — 6,5 mm Ø ⩽MS — 17 mm
Cloramfenicol (30)	⩽12 µg/ml ≈ ⩾18 mm Ø ⩾MC — 6 mm Ø ⩾MS — 4 mm	⩽25µg/ml ≈ ⩽12 mm Ø ⩽MC — 12 mm Ø ⩽ MS — 10 mm
Clindamicină (2. u.i.) (raportat la clindamicină) (raportat la lincomicină)	⩽1 µg/ml ≈ ⩾17 mm Ø ⩾MS — 9 ⩽ 0,5 µg/ml ≈ ⩾21 mm Ø ⩾MS — 5	⩾2 µg/ml ≈ ⩽14 mm Ø ⩽MS — 12 ⩾4 µg/ml ≈ ⩽16 mm Ø ⩾MS — 10
Colistină (300 U.I.) şi *Polimixină* (300 U.I.)	⩽25 U.I. ≈ ⩾11 mm Ø ⩾MC — 2 Ø ⩾MP — 2	⩾50 U.I. ≈ ⩽8 mm Ø ⩾MC — 5 Ø ⩾MP — 5

Scanned with OKEN Scanner

Eritromicină (15)	⩽ 2 μg/ml ≈ ⩾ 18 mm Ø ⩾MS — 8	⩾8 μg/ml ≈ ⩽13 mm Ø ⩾MS — 13
Gentamicină (10) pt. bacterii grampozitive și negative; pentru Pseudomonas;	⩽6 μg/ml ≈ ⩾13 mm Ø ⩾MC — 5 Ø ⩾MS — 9 ⩽4 μg/ml ≈ ⩾14 mm Ø ⩾MP — 5	⩾5—12 μg/ml ≈ ⩽12 mm Ø ⩾MC — 10 Ø ⩾MS — 10 ⩾12 μg/ml ≈ ⩽12 mm Ø ⩾MP — 7
Kanamicină (30 u.i.)	⩽6 μg/ml ≈ ⩾18 mm Ø ⩾MC — 3 Ø ⩾MS — 4,5	⩾25 μg/ml ≈ ⩽13 mm Ø ⩾MC — 8,5 Ø ⩾MS — 9,5
Meticilină (5) *Oxacilină* (1)	⩽0,5 μg/ml ≈ ⩾14 mm Ø ⩾MS — 5	⩾2 μg/ml ≈ ⩽9 mm Ø ⩾MS— 10
Nalidixic acid (30) (în infecții urinare)	⩽8 μg/ml ≈ ⩾20 mm Ø ⩾MC — 2 (?)	⩾32 μg/ml ≈ ⩽10 mm Ø ⩾MC — 12 (?)
Neomicină (30 U.I.)	? ⩾17	? ⩽12
Nitrofurantoină (300) (în infecții urinare)	⩽25 μg/ml ≈ ⩾17 mm Ø ⩾MC— 3 mm ?	⩾100 μg/ml ≈ 15 mm Ø ⩽MC — 5 ?
Novobiocină (30 U.I.)	⩽2 μg/ml ≈ ⩾22 mm Ø ⩾MS — 4	⩾16 μg/ml ≈ ⩾17 mm Ø ⩽MC — 9
Rifampicină (5) (testat pt. meningococi)	⩽2 μg/ml ≈ ⩾25 mm ?	⩾4 μg/ml ≈ ⩾24 mm ?
Streptomicină (10)	⩽4 μg/ml ≈ ⩾15 mm Ø ⩾MC — 1 Ø ⩾MS — 3	⩾64 μg/ml ≈ ⩾10 mm Ø ⩽MC — 6 Ø ⩽MS — 8
Sulfamidă (300)	? 17 mm	? 15 mm
Tetraciclină (30)	⩽2 μg/ml ≈ ⩾19 mm Ø ⩾MC — 2,5 Ø ⩾MS — 4,5	⩾16 μg/ml ≈ ⩾14 mm Ø ⩽MC — 7,5 Ø ⩽ MS — 9,5
Ticarcilină (75) (în studiu)	⩽ ? ≈ Ø 27 mm	⩾ ? Ø 24 mm
Trimetoprim 1,25 + *sulfametoxazol* 23,75 (Cotrimoxazol) 25	? Ø 32 mm	? Ø 24 mm

N.B. Unele substanțe antimicrobiene sînt livrate atît în comprimate cu conținut mare, cît și în comprimate cu conținut mai mic de substanță activă; conținutul lor trebuie deci controlat înainte de a se face interpretarea rezultatelor.

N.B. Rezultatele sînt date în mm *diametru* (Ø). Prin metoda comparativă, se măsoară *raza* (de la mijlocul tabletei sau al discului pînă la limita de inhibiție), deci cifra citită va fi dublată pentru a avea diametrul. Se ploate folosi și o riglă specială (vezi fig. 88).

Observații:

(1) *Ampicilina* este valabilă și pentru amoxicilină și nafcilină. Hemofilii sensibili la ampicilină, dar rezistenți la penicilina G, trebuie considerați ca rezistenți și la ampicilină.

(2) *Cefalotina* nu trebuie considerată valabilă pentru stafilococii rezistenți la meticilină; aceștia trebuie considerați rezistenți și la cefalotină.

(3) Discurile de *clindamicină* sînt valabile și pentru lincomicină.

(4) *Colistina* și *polimixina* difuzează slab. Rezistența este valabilă, dar susceptibilitatea, pentru infecți sistemice, trebuie neapărat confirmată prin metoda diluțiilor.

5) Discurile de *meticilină* (oxacilină și nafcilină) sînt valabile pentru toate penicilinele rezistente la beta-lactamaze și pentru controlul eficienței cefalotinei față de stafilococi.

(6) Discurile de *benzilpenicilină* sînt valabile pentru toate penicilinele sensibile la betalactamaze, cu excepția ampicilinei și carbenicilinei. Infecțiile severe cu enterococi și cu unii bacili gramnegativi pot fi tratate cu doze mari de penicilină G, dar nu cu penicilină V.

(7) *Novobiocină* nu trebuie încercată pe medii cu sînge.

Scanned with OKEN Scanner

prin difuzie în mediu) a unor germeni de fapt sensibili. Repicarea acestora din urmă poate arăta o sensibilitate normală. Acest fenomen se întîmplă, uneori, în culturi primare, dar nu în cele secundare, unde se însămînţează germeni, care sînt cu toţii în faza lor de multiplicare.

— Invazia microbiană a zonei de inhibiţie se mai poate face cu un Proteus, a cărui cultură se poate întinde către centrul zonei de inhibiţie, după ce antibioticul s-a diluat prin difuzie în mediu.

Pentru interpretarea acestor fenomene, în folosul clinicianului, este prudent să se ia în considerare diametrul zonei de inhibiţie total lipsită de colonii (vezi fig. 89). Mai bine ar fi să se discute cu clinicianul, care — în funcţie de bolnav, de localizarea infecţiei şi de starea lui generală — poate decide tratamentul, care poate fi aplicat, sau (dacă este cazul) poate iniţia alte investigaţii.

Dimensiunea zonei de inhibiţie nu traduce întotdeauna destul de fidel sensibilitatea unui germen. Astfel, germenii care cresc foarte repede (de ex., Proteus), vor avea proporţional zone de inhibiţie mai mici, decît acei care cresc mai încet (de ex., enterococ). Pentru hemofili şi piocianici, diferenţa între diametrele critice este atît de mică (1 mm), încît este greu să se facă în unele cazuri o apreciere exactă. Stafilococii rezistenţi la meticilină pot prezenta o falsă sensibilitate înşelătoare, care poate fi evitată, dacă se face o inoculare mai bogată pe un mediu suplimentat 5/100 cu NaCl şi se incubează la 30°. Stafilococii rezistenţi la meticilină trebuie consideraţi rezistenţi şi la cefalosporine, chiar dacă faţă de acestea se obţine o zonă de inhibiţie relativ mai mare. În sfîrşit, polimixina-colistina difuzează atît de încet şi de greu în mediu, încît este prudent ca, pentru acest antibiotic, să se recurgă la tehnica diluţiilor. Curba de concordanţă pentru aceste antibiotice este foarte departe de a fi satisfăcătoare (fig. 90).

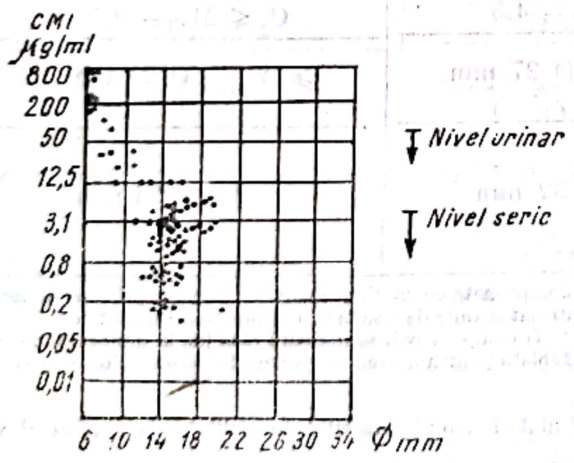


Fig. 90. — Antibiograma la polimixine-colistină. Corespondenţă slabă între C.M.I. şi diametrele zonelor de inhibiţie (după „Manual of clinical Microbiology", Lennette-Spaulding-Truand, 1974).

Situaţie specială, privind tulpinile de stafilococi, haemofili şi neisserii producătoare de β-lactamază. Infecţiile produse cu astfel de tulpini nu pot beneficia de un tratament cu penicilină G sau de ampicilină. Aceste tulpini pot fi depistate, folosind teste simple şi rapide, din care citäm 2 mai accesibile :

Metoda acidometrică. Se amestecă 2 ml soluție apoasă 0,5 g/100 *roșu neutru* cu 16,6 ml apă distilată sterilă, care se injectează într-o fiolă comercială de penicilină G. După dizolvare, se transferă într-un tub și se adaugă picătură cu picătură *NaOH* soluție 1 Normal pînă la pH 8,5, cînd apare o culoare violetă. Se prelevă 0,1 ml și se adaugă o suspensie foarte groasă din germenul examinat. Dacă tulpina are penicilinază, se produce în 1—15 minute o schimbare de culoare în galben.

Metoda iodometrică. Se prepară o soluție *proaspătă* de penicilină G 6 000 U./ml., în tampon fosfat pH 6. Se prepară o soluție de 1 g amidon în 100 ml apă distilată și se încălzește la bain marie la 100° pînă la dizolvare.

Se prepară o soluție *proaspătă* de 2,03 g iod și 53,2 g iodură de potasiu, în 100 ml apă distilată. Se amestecă în 0,1 ml soluție de penicilină cîteva colonii din germenul de cercetat (suspensie foarte groasă). După 30 minute se adaugă 2 picături soluție de amidon și o picătură de soluție iodurată. Decolorarea rapidă în 1—2 minute, pentru hemofili, și în 1/2—1 oră, pentru stafilococ, indică prezența penicilinazei.

Descrierea amănunțită a tehnicii și a condițiilor de executat și interpretat antibiograma „oficială" se găsește în „BIOS" nr. 1, 1979, difuzat de Institutul Cantacuzino.

Cauze de eroare. În executarea și interpretarea antibiogramelor, se pot ivi o serie de surse de eroare, dintre care citățm : cercetarea susceptibilității unui germen, care nu este responsabil de infecția în cauză sau testarea unui amestec de germeni (culturi mixte) ; utilizarea unor medii de cultură nepotrivite (în special, cu un pH prea alcalin sau prea acid, sau folosirea unui mediu cu glucoză sau cu altă substanță, care poate favoriza unele antibiotice și defavoriza pe altele) sau prea vechi, uscate, alterate ; utilizarea de discuri de antibiotice incorect încărcate cu antibiotic, conservate în condiții improprii sau perimate ; nestandardizarea corectă a suspensiilor microbiene și neajustarea față de standardul turbidimetric ; tamponul muiat în suspensia microbiană nu este bine stors ; neașezarea corectă a microdiscurilor cu antibiotic ; nerespectarea duratelor între turnarea plăcilor, uscare, însămînțare, plasarea discurilor și plasarea plăcilor la termostat ; necitirea corectă a diametrelor zonelor de inhibiție ; nefolosirea „controlului de calitate" etc.

4.3.1.4. CRITICA, DIN PUNCT DE VEDERE TEORETIC, A TEHNICII ANTIBIOGRAMEI DIFUZIMETRICE „OFICIALE"

Din punct de vedere teoretic, antibiograma „oficială" este criticabilă, din mai multe puncte de vedere, ceea ce face ca problema să nu fie încă pe deplin rezolvată.

În primul rînd, metoda se bazează pe premisa unei relații liniare între dimensiunea zonei de inhibiție și concentrația minimă inhibitorie a germenului studiat. În practică, însă, se constată uneori o neconcordanță între concentrația minimă inhibitorie, determinată direct prin

metoda diluţiilor, şi aceea dedusă indirect din diametrul zonei de inhibiţie (fig. 91).

Acestea se datorează în mare parte (în afara unor greşeli de tehnică şi a folosirii de materiale necorespunzătoare), vitezelor variate

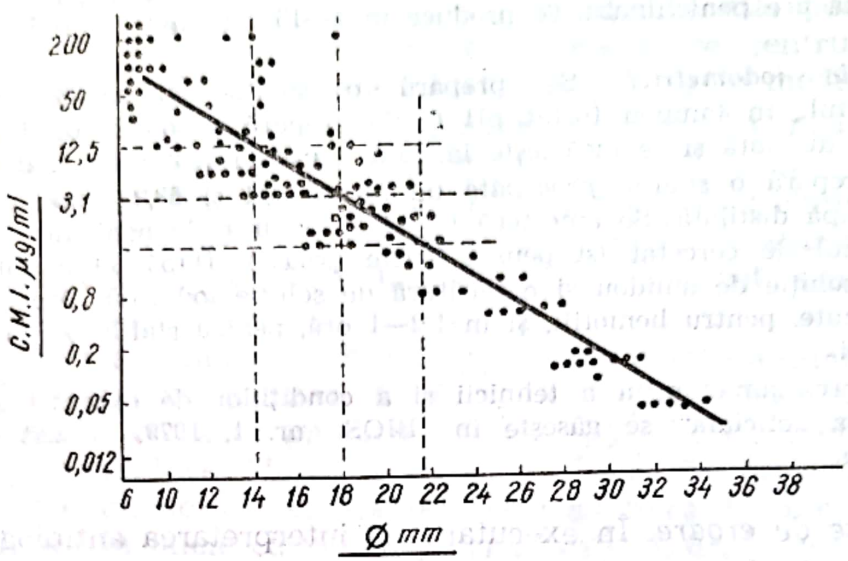


Fig. 91. — Concordanţa între ∅ zonei de inhibiţie şi C.M.I. Statistic concordanţă relativ bună, dar cu erori posibile în unele cazuri clinice particulare. Exemplu : ampicilină, disc de 10 µg. Erori posibile (diametrul zonei de inhibiţie în mm ; C.M.I. în µg/ml) : 14,5 mm → C.M.I. între 4 şi 80 ; 17 mm → C.M.I. între 1,6 şi 20 ; 21 mm → C.M.I. între 0,6 şi 16 ; C.M.I. 12 → diametrul între 8 şi 17 mm ; C.M.I. 3 → diametrul între 13,5 şi 20 mm ; C.M.I. 1,6 → diametrul între 16 şi 21 mm.

de creştere ale diferiţilor germeni cercetaţi. Într-adevăr, dacă se lucrează cu un anume germen, întotdeauna acelaşi, concordanţa este foarte bună, dar dacă se lucrează cu diferiţi germeni, atunci concordanţa poate fi defectuoasă.

Unele neconcordanţe mai pot fi datorate aproximaţiei cu care se stabileşte concentraţia minimă inhibitorie, folosind metoda diluţiilor binare.

Dimensiunea zonei de inhibiţie este în raport cu 2 factori variabili, şi anume : viteza de difuziune a antibioticului, care variază de la antibiotic la antibiotic, dar care rămîne constantă pentru fiecare antibiotic în parte, dacă se foloseşte acelaşi mediu de difuziune, şi viteza de creştere a germenului însămînţat, care poate varia de la specie la specie şi chiar de la tulpină la tulpină.

În practică, corelaţia poate fi considerată statistic satisfăcătoare, dacă se studiază un număr mare de germeni (de ex., pentru studii de interes epidemiologic), dar faţă de un anume germen necunoscut, izolat de la bolnav, concordanţa nu este întotdeauna fidelă, adică eroarea determinării concentraţiei minime inhibitorii, cunoscînd dimensiunea zonei de inhibiţie, poate atinge (în unele cazuri extreme) abateri de la simplu la de 4 ori şi chiar mai mult ! Se pot constata uneori aceleaşi zone de

inhibiție la germeni cu CMI diferite și invers (vezi fig. 91). Acest fapt constituie *primul punct slab* al metodei difuzimetrice.

Trebuie observat de la început că sensibilitatea unui germen la antibiotice este o noțiune care cuprinde, de fapt, mai multe noțiuni, în parte independente una de alta, și care se exprimă prin : concentrația minimă inhibitorie (CMI), singura care deseori este luată în seamă ; concentrația minimă bactericidă (CMB) și condițiile de producere ale acestora ; timpul minim pentru obținerea efectelor de mai sus ; timp de „refacere" sau de „convalescență" microbiană, după întreruperea contactului dintre germen și substanța antimicrobiană etc.

De asemenea, trebuie să se țină seamă că sensibilitatea *in vitro* a unui germen față de un antibiotic poate da rezultate, care variază de la simplu la peste o sută în plus sau în minus, în funcție de condițiile de lucru : mediul de cultură cu caracterele lui fizice și chimice și factorii de creștere sau de inhibiție, pH-ul, vîrsta sau/și faza de creștere a germenului studiat, iuțeala lui de creștere, bogăția inoculului, condiția de incubare (aerobă, anaerobă, cu sau fără CO_2, temperatura și durata perioadei de incubare), felul de citire și de interpretare a rezultatelor etc.

De asemenea, trebuie să se țină seamă de *neomogenitatea* unei populații microbiene și de schimbarea de sensibilitate, care se poate produce în diferite ocazii.

Pentru ca rezultatele să fie reproductibile și comparabile, s-a căutat să se stabilească calitatea diferitelor ingrediente, să se fixeze condițiile de lucru și să se precizeze înțelesul diferiților termeni. Astfel, s-au indicat condițiile de dorit pentru mediile de cultură, bogăția și modul de execuție ale inoculului. și calitățile discurilor de antibiotice, precum și modul de citire și de interpretare a rezultatelor.

Cu toate încercările făcute, punctele de mai sus nu au putut fi rezolvate în mod optim nici pe plan mondial, constituind tot atîția factori de nesiguranță.

Mediul de cultură constituie *al doilea punct slab* al metodei, deoarece nu este practic posibil, deocamdată, să dispunem de un mediu bun și cu calități riguros constante de la un lot la altul. El trebuie să permită creșterea rapidă a majorității germenilor de testat, să nu aibă substanțe inhibitoare nici față de unii germeni și, mai ales, nici față de unele substanțe antimicrobiene.

Bogăția inoculului și viteza de creștere a germenului sălbatic de cercetat, precum și bogăția inoculului germenului martor de referință, constituie *al treilea punct slab* al metodei, care nu și-a găsit o soluție mulțumitoare (diametrele zonelor de inhibiție pot varia cu 4 mm, pentru stafilococ, și cu 2 mm, pentru E. coli, dacă inoculul a fost prea sărac sau prea bogat). Un alt punct de nesiguranță, care nu poate fi apreciat, este viteza de creștere variabilă a diferiților germeni sălbatici. Germenul care crește mai repede va avea o zonă de inhibiție mai mică, decît a unui germen care crește mai încet, deși poate avea același CMI.

Discurile cu antibiotice constituie *al patrulea punct slab* al metodei difuzimetrice, deoarece nu s-a putut, pe plan internațional,

Scanned with OKEN Scanner

să se obţină discuri cu conţinut riguros egal şi cu o conservabilitate mulţumitoare.

Într-adevăr, nu s-au putut obţine, cu tot controlul riguros executat de Food and Drug Administration în S.U.A. şi cu toate recomandările O.M.S., discuri total satisfăcătoare. Din această cauză, recomandările O.M.S. specifică că se pot accepta loturi de discuri, dacă conţinutul lor este cuprins între 75 şi 135% din cantitatea indicată (adică aproape de la simplu la dublu) şi că se poate accepta o şarjă de discuri, dacă 90% din ele, plasate pe mediul de cultură, însămînţat cu un germen de referinţă, nu dau între ele diferenţe de zone de inhibiţie mai mari de 2,5 mm ∅.

Valabilitatea discurilor cu peniciline şi cefalosporine este prea mică şi condiţiile de conservare optimă sînt nepractice (conservate la adăpost de umiditate între —20° şi +4°), cu specificaţia că un flacon sau tub cu discuri odată deschis nu mai trebuie utilizat decît maximum o săptămînă.

Încorporarea de antibiotic uscat, într-o pulbere inertă şi pastilat ca atare, prezintă dificultăţi tehnice în găsirea unui liant inactiv, în asigurarea uniformităţii lor, în marcarea discurilor vizibil pe ambele feţe şi în manipularea lor, dar ar putea prelungi valabilitatea lor. Utilizarea de sulfat de sodiu ca liant, ca în discurile noastre, este contraindicată, deoarece interferează cu o serie de antibiotice.

Folosirea penicilinelor şi a cefalosporinelor sub formă microcristalină asigură o stabilitate şi o conservabilitate mai mare decît forma amorfă. Se recomandă ca atunci cînd se folosesc solvenţi, ei să fie perfect „uscaţi", adică lipsiţi de apă şi ca evaporarea acestora să se facă în vacuum, la temperatură joasă.

Modul de interpretare a rezultatelor constituie ***al cincilea punct slab*** al metodei, deoarece se folosesc criterii convenţionale, deseori discutabile, împărţind germenii în sensibili, rezistenţi şi intermediari, ceea ce nu corespunde deseori cu situaţia bolnavului, care depinde de mulţi alţi factori, care nu ţin de sensibilitatea germenului la antibiotic. Exprimarea în CMI şi CMB în μg/ml ar fi mai ştiinţifică, dar mai greu de interpretat de majoritatea medicilor.

Controlul de calitate, aşa cum este redat în recomandările O.M.S. şi F.D.A., nu este satisfăcător, nefiind suficient de exigent şi constituie ***al şaselea punct slab*** al metodei, deoarece nu asigură controlul uniformităţii discurilor şi acceptă variaţii foarte mari în repetarea examenelor. Într-adevăr, se tolerează pentru diversele antibiotice abateri, a căror deviaţie standard să fie între 0,5 şi 2,5 mm, în diametrul zonelor de inhibiţie, apropiindu-se astfel foarte mult de limitele critice, care delimitează germenii sensibili de cei rezistenţi.

Cu toate imperfecţiunile ei, tehnica antibiogramei „oficiale" este acceptată în mai toate ţările avansate şi este socotită ca satisfăcătoare la data aceasta. Tehnica este încă prea dificilă pentru majoritatea laboratoarelor şi, în practica zilnică, se execută de fapt o serie de variante simplificate şi tehnici de compromis (bineînţeles, cu o oarecare scădere a valorii antibiogramei).

Scanned with OKEN Scanner

4.3.1.5. TEHNICI DE COMPROMIS. NECESITATEA UNOR CONTROLURI. CONDIȚII DE ACCEPTABILITATE

În practică, se utilizează deseori aproape orice mediu, chiar și medii diferențiale și selective. Se însămînțează orice germen izolat, deseori un amestec de germeni, bogăția inoculului este variată, se utilizează discuri, indiferent dacă sînt perimate sau conservate defectuos, uneori se face o predifuziune, alteori nu, și în fine se face o citire cu ochiul liber, nemăsurînd diametrele zonelor de inhibiție și considerînd că antibioticul cel mai activ și de recomandat este acela care realizează o zonă de inhibiție mai mare. Detaliile tehnice ale diferitelor operații variază des de la un laborator la altul. Bineînțeles, aceste condiții sînt inacceptabile și ar trebui interzise, deoarece pot fi mai mult dăunătoare decît utile.

Condițiile minime acceptabile, care sînt ușor de realizat în orice laborator, sînt următoarele :

— Utilizara unei geloze nutritive simple, cu pH 7,2—7,4 (de preferință Mueller-Hinton pentru antibiogramă, livrat de Institutul Cantacuzino).

— *Utilizarea obligatorie a tulpinilor martor de referință*, livrate de asemenea de Institutul Cantacuzino.

— Însămînțarea unui germen singur și sigur reprezentativ și responsabil de infecția care trebuie combătută.

— Standardizarea, pe cît posibil, a bogăției inoculului.

— Renunțarea la predifuziune : măsurarea exactă în mm a diametrelor zonelor de inhibiție atît la germenii-martori, cît și la acel în studiu.

— Consultarea obligatorie a *tabelelor de criterii de interpretare a rezultatelor.*

— Considerarea ca greșite a antibiogramelor, la care diametrele zonelor de inhibiție, obținute cu diverse antibiotice, față de germenii de referință, nu sînt în limitele acceptabile. Aceasta reprezintă un oarecare control de calitate a mediului de cultură și a lotului de discuri utilizate.

— Comunicarea rezultatelor conform indicațiilor din „Tabelul criteriilor de interpretare a rzultatelor“ (vezi tabelul XIV). De ex., dacă se studiază un stafilococ, la care diametrul zonei de inhibiție pentru cloramfenicol este de 18 mm și pentru penicilină de 20 mm, se va da răspunsul *sensibil* la cloramfenicol, dar *rezistent* la Penicilină !

— Admiterea unor compromisuri privitoare la un inocul prea bogat (cu colonii confluente) și unul prea sărac (cu colonii separate). În primul caz, diametrele vor fi mai mici, iar în al doilea mai mari, variații care pot fi socotite la $\pm$ 1 mm.

Laboratoarele care respectă aceste indicații pot fi socotite utile pentru studii statistice și epidemiologice și (cu oarecare rezervă) pentru a fi în folosul bolnavilor. În aceste din urmă situații, trebuie să se facă eforturi către mai bine, apropiindu-se pe cît posibil de tehnica antibiogramei „oficiale“ sau să se recurgă, după cum sfătuim noi, la antibiograma îmbunătățită comparativă.

Scanned with OKEN Scanner

În lipsa discurilor de antibiotice standardizate, se poate recurge la nevoie, la metode artizanale (vezi *Anexa 4*), cu condiția să se folosească tehnica comparativă.

4.3.1.6. TEHNICA COMPARATIVĂ ÎMBUNĂTĂȚITĂ

Tehnica îmbunătățită comparativă, propusă aici, asigură îndeplinirea *tuturor* condițiilor de lucru și de interpretare specificate în „antibiograma oficială", neavînd deci nici un factor în minus. Ea permite însă, în plus, înlăturarea în mare parte a erorilor, datorate unor variații în calitatea mediilor de cultură și a discurilor cu antibiotice utilizate.

În tehnica „oficială", executarea controlului de calitate se face cu alt disc de antibiotic decît cel folosit în antibiogramă, plecînd de la premisa că toate discurile din aceeași șarjă sînt egale între ele, ceea ce nu este (după cum am văzut mai sus) întotdeauna exact, mai ales acolo unde controlul discurilor nu este destul de exigent. Erorile datorate unor variații în bogăția inoculului sînt încă aceleași în tehnica „oficială" și în aceea „îmbunătățită", ele neputînd fi înlăturate.

Rămîn, de asemenea, necunoscutele legate de viteza de creștere a tulpinilor sălbatice de cercetat.

Tehnica comparativă îmbunătățită permite (pe lîngă aceeași interpretare a rezultatelor, ca și tehnica oficială) și o interpretare flexibilă, în raport cu rezultatele obținute de același disc de antibiotice, atît asupra germenului martor de referință, cît și asupra germenului de cercetat, dezvoltați în aceeași zi pe același mediu de cultură. Citirea este mai comodă și interpretarea este deseori oarecum posibilă, chiar fără a consulta „Tabelul criteriilor de interpretare a rezultatelor".

Din aceste motive, recomandăm călduros tehnica îmbunătățită difuzimetrică, a cărei execuție poate fi la îndemîna oricărui laborator, în care se practică antibiograma.

Tehnica de lucru. Se folosesc, de preferință, cutii tip Petri pătrate (eventual improvizate, vezi *4.3.1.1.1.1.*), cu latura utilă (adică cu gelozã) de 120 mm (fig. 92). Fundul cutiei trebuie să fie perfect plan, ceea ce este ușor realizabil în modelul improvizat. În momentul turnării, cutia se plasează pe un plan perfect orizontal, ceea ce este obligatoriu. În aceste condiții, grosimea gelozei poate fi redusă la 2 mm sau chiar mai puțin, fără a mări simțitor dimensiunile zonelor de inhibiție, atît ale germenilor de referință, cît și ale germenilor de cercetat.

În tehnica comparativă, suprafața mediului este împărțită în 2 sau mai multe arii de aprox. 30 mm lățime pe 12 mm lungime, una însămînțată cu germenul de cercetat, iar aria alăturată, cu germenul de referință, lăsînd un interval liber de aprox. 5 mm. Discurile cu antibiotice sînt plasate pe interlinia dintre cele 2 arii, la 17—20 mm distanță

între ele * (fig. 93). Însămînţarea poate fi uşurată, dacă se folosesc unele dispozitive simple de limitare a zonelor de însămînţat (eventual un simplu şablon), fie în linie dreaptă, de preferinţă în cutii tip Petri

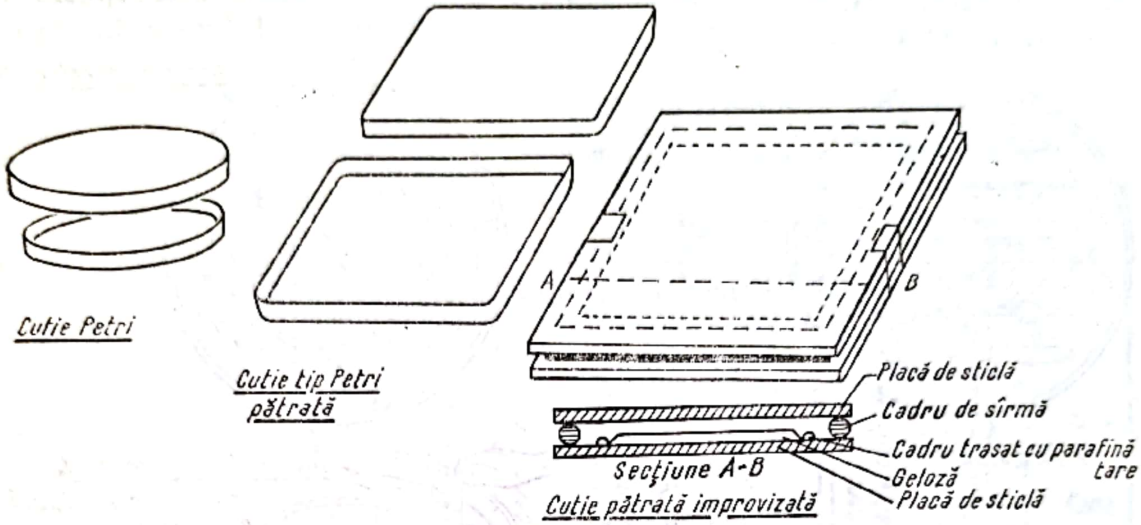


Fig. 92. — Cutii tip Petri (rotunde şi pătrate) şi cutie pătrată improvizată pentru antibiogramă.

Fig. 93. — Utilizarea cutiei pătrate improvizate pentru antibiograma comparativă.

Mersul operaţiilor :

— Se plasează şablonul pe un plan *perfect orizontal,* apoi se acoperă cu o placă de sticlă (150/150 mm).

— Cu o bucată de parafină tare, se delimitează un pătrat de 120/120 mm, pe linia triplă.

— Se toarnă, cu băgare de seamă, 30 ml geloză (topită şi răcită la 50°), în mijlocul pătratului (geloza se va opri la liniile de parafină).

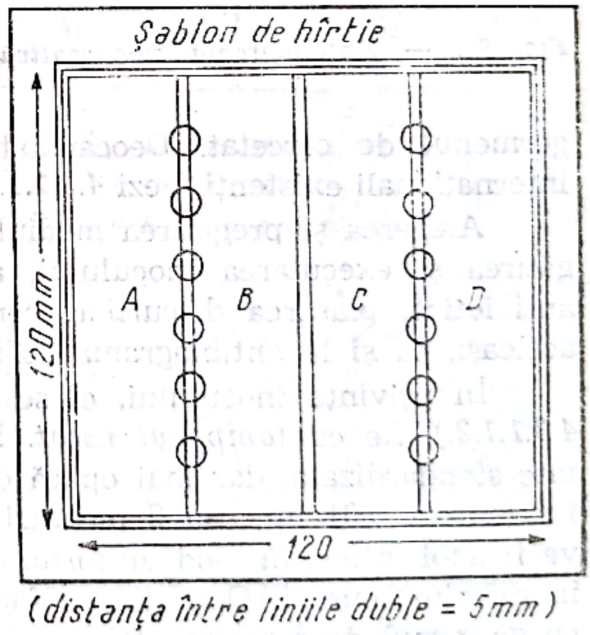
— După răcirea şi întărirea gelozei, se însămînţează ariile *A* şi *C* cu germeni de cercetat şi ariile *B* şi *D* cu germeni de referinţă.

— Se plasează 6—7 discuri cu antibiotice în locurile însemnate cu O.

— Se plasează cadrul de 140/140 mm (fabricat din sîrmă de 4 mm) şi se acoperă cu a 2-a placă de sticlă (150/150 mm).

— Se fixează totul la un loc cu 2—4 benzi adezive şi se pune la termostat.

N. B. Dacă se cercetează sensibilitatea unui singur germen faţă de 6 antibiotice, se delimitează cu parafină un dreptunghi de 120/50 mm, în care se toarnă 12 ml geloză. Restul operaţiunilor decurg ca mai sus.



* Recomand, uneori, plasarea mai apropiată (15 mm între discuri) şi cu învecinarea lor judicioasă (de ex., betalactamine cu oligozaharide). În felul acesta, se poate deseori aprecia şi efectul asocierii între antibioticul învecinat şi efectul eventual bactericid cu antibioticul izolat sau în combinaţie (vezi mai departe).

pătrate, fie mult mai incomod şi mai dificil de execuţat, în cerc, în cutii Petri obişnuite de 90—100 diametru (fig. 94).

Dacă este posibil, se alege ca germen de referinţă unul de sensibilitate constantă şi cunoscută, de preferinţă asemănător ca specie cu

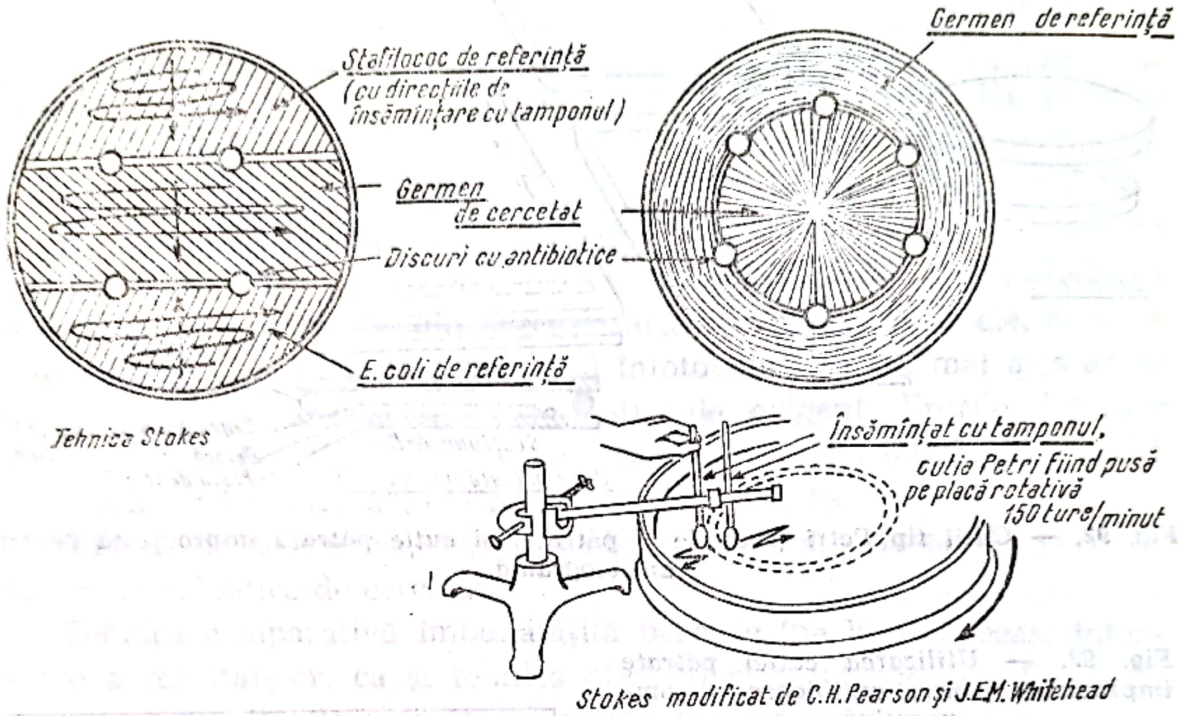


Fig. 94. — Antibiograma comparativă (tehnica Stokes originală şi modificată).

germenul de cercetat. Deocamdată, se folosesc germenii de referinţă internaţionali existenţi (vezi *4.3.1.1.1.3.*).

Alegerea şi pregătirea mediului de cultură, controlul pH-ului, pregătirea şi executarea inoculului, alegerea şi conservarea discurilor de antibiotice, plasarea discurilor, condiţiile de incubare şi de citire sînt aceleaşi, ca şi la antibiograma „oficială" (vezi *4.3.1.1.*).

În privinţa inoculului, el se poate face fie cu *tamponul ud* (vezi *4.3.1.1.2.*), fie cu *tamponul uscat.* Din suspensia microbiană de turbiditate standardizată, dar mai opacă de 2 ori, se pune pe mediu un volum fix (aprox. 0,01 ml, sau 2 picături, sau se folosesc anse calibrate), care va fi apoi întins, în mod uniform, cu *un tampon de vată uscată*, plimbat în diferite sensuri. Operaţia se face separat, dar pe arii alăturate, atît cu germenul de cercetat, cît şi cu germenul (martor) de referinţă.

Zonele de inhibiţie, obţinute cu diversele discuri de antibiotice, faţă de germenul (martor) de referinţă, trebuie să fie cuprinse între limitele tolerate ale standardului F.D.A. şi ale recomandărilor O.M.S. din 1977 (vezi şi „Metode de Laborator", de uz curent, vol. II, Ministerul Sănătăţii şi Academia de Ştiinţe Medicale, şi BIOS nr. 1 din 1979, Institutul Cantacuzino). Aceste limite sînt redate în tabelul XIII.

Scanned with OKEN Scanner

Acest examen asigură în mod simultan controlul calității mediului și a discurilor cu antibiotice, pentru fiecare disc în parte. După 18—24 de ore de incubare, se citesc rezultatele (redăm în fig. 95 un exemplu).

În metoda comparativă, se măsoară *raza de inhibiție* pornind de la centrul discului cu antibiotice. Pentru a se putea referi la tabelul

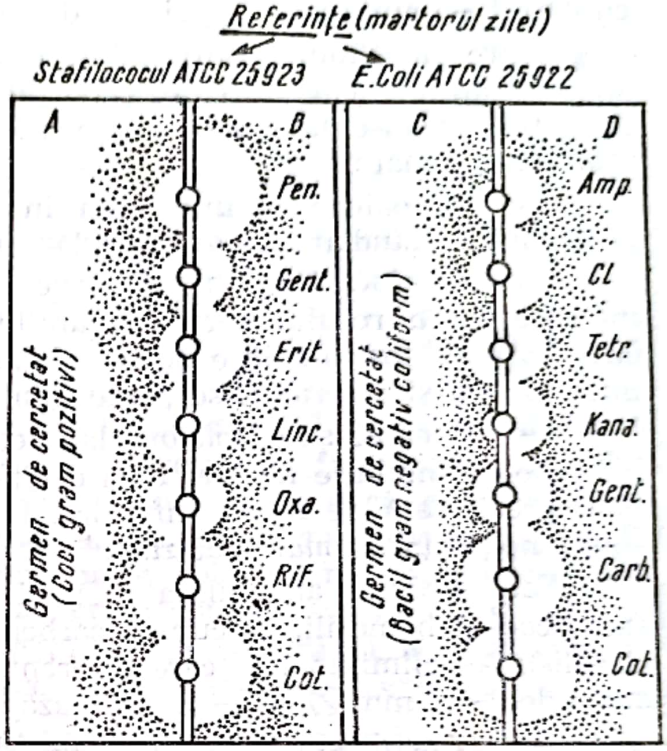


Fig. 95. — Antibiograma comparativă (rezultate). *Exemplu de cercetare:* un coc grampozitiv și un bacil coliform.

Interpretare:

— Se compară raza zonei de inhibiție din *B* și *D* de la germenul de referință (martorul zilei), cu raza zonei de inhibiție din *A* și *C* a germenului de cercetat (proba).

— Se elimină, dintr-o privire, antibioticele care determină, la germenul de cercetat, zone de inhibiție mult mai mici decît acelea determinate la germenul de referință.

— Se iau în considerare antibioticele care determină, la germenul de cercetat, zone de inhibiție cît mai mari.

Vezi și tabelul XIV.

diametrelor critice recomandate de O.M.S., se convertește raza în diametru, prin înmulțire cu 2, sau se folosește o riglă specială, avînd o scară obișnuită în mm și una care exprimă raza convertită în diametru (vezi fig. 88).

Se măsoară, cu grijă, în primul rînd, dimensiunile zonelor de inhibiție (vezi mai sus), produse de diferite antibiotice față de germenii de referință (martorii zilei respective). Se notează regulat, în caietul de lucru, martorul zilei, pentru fiecare antibiotic cercetat.

În metoda comparativă, se măsoară, cu grijă, *raza de inhibiție*, măsurată de la centrul discului de antibiotic (astfel „raza" din metoda comparativă este jumătate din „diametrul" din metoda difuzimetrică clasică). Zonele de inhibiție, față de germenii de referință, trebuie să fie cuprinse în limitele tolerate, conform indicațiilor date în antibiograma „oficială" (tabelul XII) („Controlul de calitate").

În continuare, se măsoară cu grijă dimensiunile (razele) zonelor de inhibiție, obținute la germenul de cercetat.

Exprimarea rezultatelor poate fi făcută conform indicațiilor din antibiograma „oficială" (cu observația de mai sus a convertirii razelor în diametre). Rezultatele se mai pot (și este din ce în ce mai des admis de mulți autori) exprima în mod *flexibil*, în raport cu martorii zilei.

În metoda comparativă, aprecierea se poate face des dintr-o singură privire, avînd mereu în față martorul și proba pe același mediu, față de același disc de antibiotic (vezi fig. 95).

Este sigur activ, față de un germen sălbatic (de cercetat), antibioticul care produce la acesta o zonă *mai mare* (de preferință) sau *egală* (eventual) sau chiar *aproape egală*, cu cea produsă la martor (mai mică cu 0,5—1—3 mm rază — vezi mai departe).

Între mai multe antibiotice, este activ, față de un germen de studiat, antibioticul la care raportul dintre dimensiunea zonelor de inhibiție, produse la germenul de studiat, față de cea de la germenul martor, este mai mare.

Ce se poate însă înțelege printr-o zonă de inhibiție produsă la germenul de studiat „aproape egală" cu cea de la martor ?

Dacă se iau drept bază cifrele indicate în „Tabelul criteriilor de interpretare a rezultatelor" din antibiograma „oficială" (tabelul XIV), cifre care au fost stabilite pe baza unor numeroase studii de colaborare între clinică și laborator, se poate ajunge la următoarele concluzii :

— Germenii sînt *sensibili* la acele antibiotice, care produc asupra lor zone de inhibiție nu mai mici decît cu 2—3 mm rază, față de martor (mai precis față de media cifrelor admise pentru martor), sau cum am spune noi, față de *martorul zilei.*

Fac excepție ampicilina și penicilina G, atunci cînd se testează stafilococi și hemofili, precum și carbenicilina, cînd se testează piocianici, și colistina-polimixina, la care diferența în minus nu trebuie să fie mai mare de 1—2 mm ∅ (0,5—1 mm rază).

— Germenii sînt *rezistenți* la acele antibiotice, care produc asupra lor zone de inhibiție mai mici cu 10 mm ∅ (5 mm rază), față de martorul zilei. Fac excepție aminoglicozidele, față de Pseudomonas, colistina, carbenicilina și cotrimoxazolul, la care diferența nu va fi mai mică cu 6—8 mm ∅ (3—4 mm rază), precum și cefalosporina și eritromicina, la care diferența nu va fi mai mică cu 6—8 mm ∅ (3—4 mm rază), iar pentru penicilină G, față de alți germeni decît stafilococii, nu trebuie să fie mai mică cu 20 mm ∅ (10 mm rază), față de martorul zilei.

Practic, pentru utilizarea în clinică, se alege acel antibiotic, de preferință bactericid, care produce la germenul de testat o zonă de inhibiție cît mai mare față de aceea de la martor și care prin însușirile lui farmacologice ar permite ca, la bolnavul de tratat, să se obțină în focarele infecțioase nivelul antimicrobian cel mai ridicat și netoxic. De remarcat, însă, că o zonă de inhibiție nulă la sulfamide și la cotrimoxazol nu contraindică întotdeauna utilizarea lor, în unele infecții urinare.

Avînd în vedere inegalitatea posibilă în calitățile mediilor de cultură și în activitatea discurilor (fie din fabricare, fie din conservare în condiții improprii sau un timp prea îndelungat), recomandăm călduros să se folosească *metoda comparativă*, în care se face concomitent, pentru fiecare disc în parte, atît controlul de calitate al discului și al mediului de cultură, față de tulpina de referință, cît și însăși testarea tulpinii de cercetat.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatele pot fi exprimate, în mai multe feluri, şi anume : cu calificativele „sensibil", „rezistent" şi „intermediar", conform indicaţiilor F.D.A. şi O.M.S. ale antibiogramei „oficiale" ; exprimînd diametrul în mm al martorului zilei şi al probei, fără alte comentarii ; în mod *flexibil*, în raport cu diametrul zonelor de inhibiţie, obţinute cu germenii martori.

Se poate spune : zona de inhibiţie a germenului testat, produsă de cutare antibiotic, este atît la sută faţă de cea produsă la martor (aceasta implică un mic calcul suplimentar incomod), sau mai comod se poate da, pur şi simplu, diferenţa în mm a zonei de inhibiţie, obţinută la germenul cercetat, faţă de aceea de la martor, de ex. : pentru antibioticul cutare sensibil = M + 1 mm rază, adică mai mare decît la martor cu 1 mm ; sau M-3, adică mai mică decît la martor cu 3 mm, sau alt germen este rezistent M-12 mm rază mai mică decît la martor. Credem că ultimul fel de exprimare prezintă avantajul simplităţii şi are, în plus, o oarecare valoare orientativ-cantitativă. Ultimul fel de exprimare tinde să fie admis oficial pentru Pseudomonas aeruginosa.

Concluzii. Antibiograma difuzimetrică „clasică", aşa cum este ea de neprecisă şi supusă la erori, care pot da rezultate fals pozitive sau fals negative în 10 sau chiar 20% din cazuri, chiar dacă este executată corect, este sigur utilă şi, deocamdată, nu ne putem dispensa de ea. Ea poate fi însă îmbunătăţită, în bună parte, folosind metoda comparativă, mai ales acolo unde nu pot fi asigurate condiţii optime : condiţiile de strictă standardizare, controlul mediilor de cultură şi al discurilor cu antibiotice, condiţiile de conservare şi de utilizare a discurilor.

Renunţarea la metoda difuzimetrică, în favoarea metodei diluţiilor, executată automat cu aparate moderne, nu pare să fie deocamdată de actualitate, deoarece implică o aparatură delicată, de achiziţionare şi întreţinere scumpă, precum şi o aprovizionare ritmică cu medii speciale de cultură şi cu antibiotice anume dozate şi condiţionate. Sistemul Micromedia Mic este foarte rapid, uşor, comod, dar implică de asemenea ultimele condiţii.

Antibiograma, deşi de valoare orientativă, este *indispensabilă* dacă este cerută, executată şi interpretată în cunoştinţă de cauză şi cu simţ critic.

4.3.1.7. ANTIBIOGRAMA CU ASOCIERI DE ANTIBIOTICE

Determinarea acţiunii combinate de mai multe antibiotice faţă de un germen se poate face, de asemenea, folosind metoda difuzimetrică şi chiar pe baza simplei antibiograme clasice sau comparative, dacă distanţa dintre discuri este redusă la 15 mm şi dacă alăturarea diferitelor antibiotice s-a făcut în mod judicios (betalactamine lîngă oligozaharide sau, în cazuri speciale, o betalactamină lîngă cloramfenicol). Distanţa de 15 mm între discuri este suficientă pentru ca zonele de inhibiţie să se încalce, pentru majoritatea antibioticelor active. Acelea care dau zone mai mici de inhibiţie, foarte probabil nici nu vor putea fi luate în considerare, pentru un eventual tratament asociat la bolnavul în cauză

Scanned with OKEN Scanner

(se citează excepţia, cînd streptomicina singură este total inactivă, dar poate întări acţiunea bactericidă a penicilinei asupra unor enterococi).

Din studiul regiunii de întrepătrundere a zonelor de inhibiţie, produse de 2 antibiotice învecinate, se poate deduce, dacă este *indiferenţă* (fiecare zonă nemodificată), dacă este *sinergie* (zonă de inhibiţie mărită la locul de întrepătrundere a zonelor) sau dacă este *antagonism* (una sau ambele zone de inhibiţie sînt micşorate) (fig. 96).

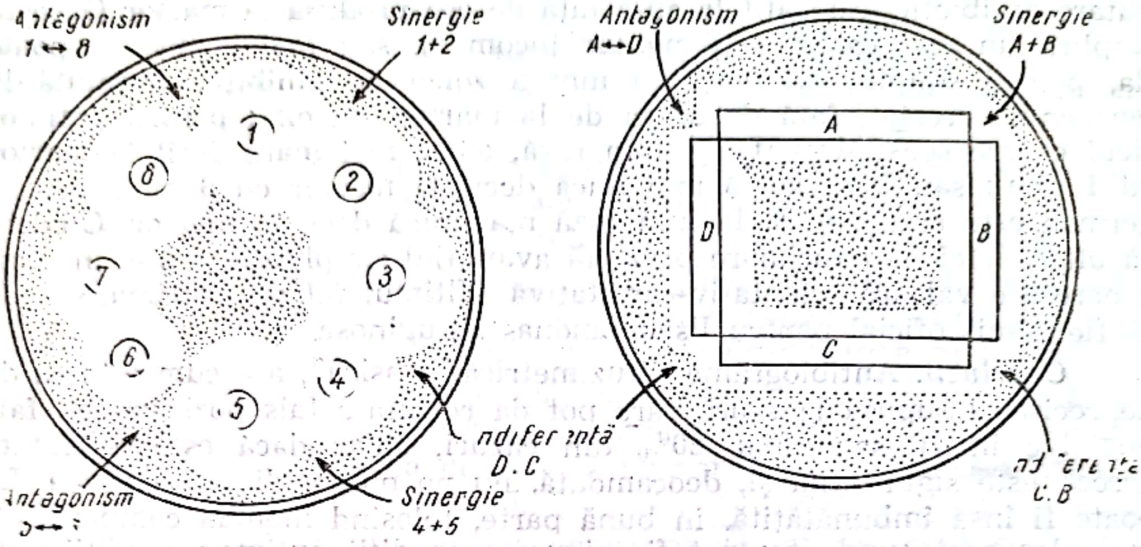


Fig. 96. — Antibiograma. Acţiune asociată a două antibiotice.

Acţiunea asocierii de antibiotice este mai uşor de apreciat, dacă pe suprafaţa unei geloze, însămînţate cu germenul în cauză, se depun în unghi drept benzi de hîrtie de filtru de aprox. 50/5 mm, îmbibate cu antibioticele de cercetat. Îmbibarea se face înmuind benzile de hîrtie de filtru în soluţia de antibiotic; se scoate apoi excesul de antibiotic, prin aplicarea rapidă a benzilor pe o sugătoare, înainte de a fi aplicate pe geloză însămînţată. Concentraţia soluţiei nu are mare importanţă, se alege de obicei în mod clasic, o soluţie între 100 şi 1 000 µg/ml şi anume: 1 000 µg/ml, pentru carbenicilină, cloramfenicol, kanamicină şi streptomicină; 100—400 µg/ml, pentru ampicilină, penicilină, eritromicină, tetraciclină (este de discutat dacă folosirea concentraţiilor mari citate mai sus nu ar putea da informaţii nevalabile faţă de nivelurile care se obţin de obicei la bolnavi).

Citirea se face după incubare de 18—24 ore la termostat, folosind criteriile de mai sus (vezi fig. 96).

Dacă se face un „decalc" (vezi *4.3.1.8.*), se poate aprecia, folosind o simplă antibiogramă, nu numai sensibilitatea unui germen la mai multe antibiotice, dar şi informaţiile asupra unei eventuale acţiuni asociate a două antibiotice şi asupra acţiunii bactericide, care ar putea fi produsă de unul sau de asocierea de 2 antibiotice.

Această cercetare, ca şi cercetarea acţiunii bactericide a unor asocieri de antibiotice, se întreprinde foarte rar, în cazurile uşoare, dar ele devin obligatorii, în tratamentul endocarditelor şi, uneori, şi al altor

infecţii grave, în special datorate enterococilor, unde asocierea de penicilină, eventual de ampicilină, cu un oligozaharid este des imperios indicată.

4.3.1.8. APRECIEREA ACŢIUNII BACTERIOSTATICE (CMI) ŞI BACTERICIDE (CMB)

Concentraţia minimă inhibitorie (CMI) a unui antibiotic faţă de un germen se determină prin metoda difuzimetrică, folosind o curbă de concordanţă, graţie căreia se poate deduce, cunoscînd diametrul zonei de inhibiţie produs de un disc stas, care este CMI corespunzătoare (vezi fig. 85 şi 86). Rezultatele sînt statistic valabile, dar nu totdeauna, pentru unele cazuri de excepţie (vezi fig. 91).

Acţiunea bactericidă a unui antibiotic izolat sau (şi) în asociere se determină simplu, prin metoda difuzimetrică, dar nu poate da decît indicaţii orientative.

În cazul endocarditelor, al septicemiilor şi în alte cîteva situaţii, se recurge la metoda mai laborioasă, folosind metoda diluţiilor şi a transplantelor (vezi *4.3.2.*).

Aprecierea orientativă a acţiunii bactericide, cel mai simplu şi mai comod, se face printr-un „decalc" de pe antibiograma clasică sau comparativă. Pentru aceasta, se aplică pe zona de inhibiţie a antibioticelor cunoscute că pot avea acţiune bactericidă, o fîşie de hîrtie de filtru de 10/50 mm, avînd grijă ca un capăt al acesteia să fie aplicat tangenţial cu discul de antibiotic. Pe fîşie vor adera germenii aflaţi în regiunea respectivă. Fîşia este apoi ridicată şi aplicată pe suprafaţa unei geloze fără antibiotic şi apoi ridicată. De pe fîşie, vor rămîne pe geloză un număr de germeni transferaţi. După 18—24 de ore de incubaţie, se poate aprecia dacă sînt germeni supravieţuitori şi pînă la ce distanţă de discul de antibiotic au crescut (fig. 97).

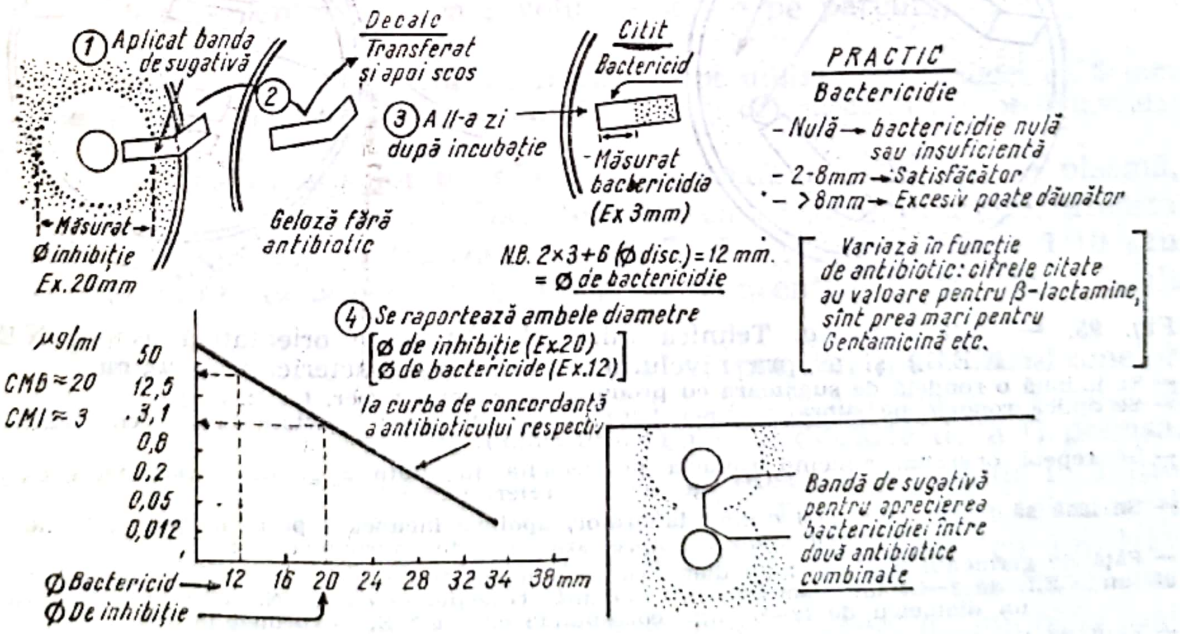


Fig. 97. — ***Antibiograma.*** Aprecierea efectului bactericid, prin metoda difuzimetrică şi a decalcului, pe mediu fără antibiotic.

Scanned with OKEN Scanner

Cunoscînd diametrele zonelor de inhibiţie (de pe antibiogramă) şi de acţiune bactericidă (de pe „decalc"), se poate, folosind o curbă de concordanţă, aprecia aproximativ atît CMI, cît şi CMB ale germenului studiat (vezi fig. 97). Transferul (decalcul) poate fi făcut chiar la 6—10 ore de la însămînţare, pentru a avea un rezultat aproximativ, privind şi CMI şi CMB, pînă a doua zi.

Pentru decalc, se pot folosi benzi de hîrtie de filtru de 10/50 mm, sterilizate la căldură umedă, lăsată să se usuce şi păstrate într-o cutie Petri sterilă, pînă în momentul utilizării. Pentru a recunoaşte dacă, cu ocazia decalcului, nu s-a antrenat şi antibiotic, este bine ca fîşia, după ce a fost aplicată pe suprafaţa gelozei fără antibiotic, să fie lăsată pe loc cîteva minute, apoi deplasată pe o regiune învecinată, mai sigur lipsită de antibiotic. Este de notat faptul că prin decalc nu se pot antrena decît un procent relativ mic de germeni. Tehnica poate fi simplificată, folosind în practică, eventual, o tehnică minimală (fig. 98).

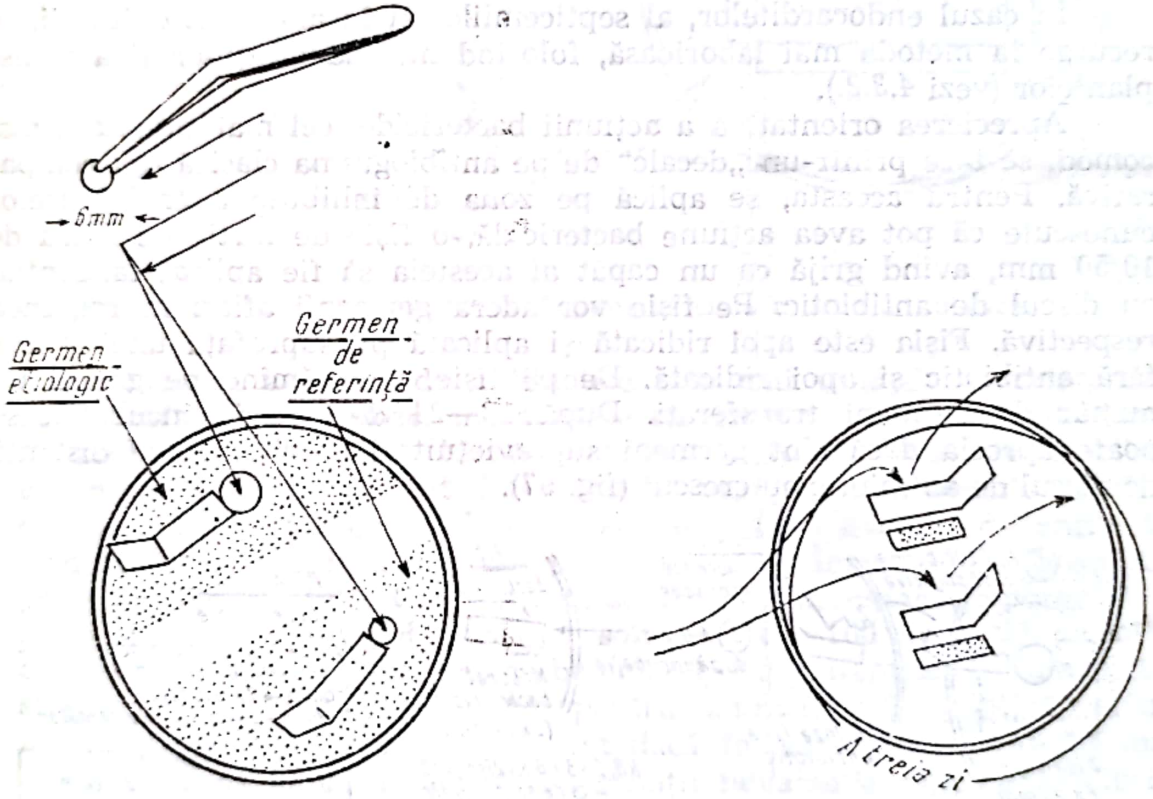


Fig. 98. — Antibiograma. Tehnica minimală. Indicaţie orientativă asupra N.E.I. (şi N.E.B.) şi asupra nivelului inhibitor (şi bactericid) în μg/ml.

— Se îmbibă o rondelă de sugătoare cu produsul de examinat (ser, L.C.R. etc.).
— Se aplică rondela pe suprafaţa unei geloze, însămînţată pe jumătate cu germenul etiologic (pentru N.E.I.).
— Se repetă operaţia, aplicînd rondela pe cealaltă jumătate a gelozei, însămînţată cu un germen de referinţă.
— Se lasă să predifuzeze 2—3 ore în laborator, apoi se incubează peste noapte la termostat.
A doua zi, se apreciază (foarte aproximativ) :
— Faţă de germenul etiologic : un diametru al zonei de inhibiţie de 7 mm, corespunde aprox. cu un N.E.I. de 2—4 ; un diametru de 8—10 mm, corespunde cu un N.E.I. exprimat în zeci ; un diametru de 12—20 mm, corespunde cu un N.E.I. exprimat în sute.
— Faţă de germenul de referinţă orientarea se va face pe baza diagramei de corespondenţă a antibioticului respectiv.
— Se va face transfer cu bandă de hîrtie sugătoare pe geloză, pentru aprecierea bactericidiei.

Scanned with OKEN Scanner

O metodă mai elegantă, dar mai pretenţioasă, constă din întreruperea acţiunii antibioticului după 5—6 ore de la începutul acţiunii lui, folosind o pulverizaţie cu aerosoli dintr-o enzimă inactivatoare (de ex., penicilinază).

Cercetarea acţiunii bactericide apare din ce în ce mai importantă, în cazurile grave de endocardite şi septicemii, deoarece se pot decela tulpini, de ex. de stafilococ, la care CMB, în loc să fie de 2—4 ori mai mare ca CMI, să fie de peste 100 ori mai mare, în felul acesta, explicînd eşecul tratamentului, instituit pe baza simplei antibiograme.

Pe baza datelor clinice şi paraclinice, a datelor epidemiologice şi pe baza experienţei anterioare, în cazuri similare, uneori ajutaţi substanţial şi de antibiogramă şi cunoscînd farmacologia antibioticelor, care pot fi utilizate la un anume bolnav, se poate institui un tratament raţional sau chiar ştiinţific.

Controlul eficacităţii tratamentului se face pe baza rezultatelor clinice şi paraclinice, precum şi prin determinarea nivelurilor de eficienţă antimicrobiană, obţinute la bolnav, în cursul tratamentului cu antibiotice.

4.3.1.9. APRECIEREA ORIENTATIVĂ A NIVELULUI DE EFICIENŢĂ INHIBITORIE (NEI) ŞI BACTERICIDĂ (NEB)

Aceste aprecieri se pot face simplu şi uşor de executat în orice laborator de bacteriologie. Pe suprafaţa unei geloze (Mueller-Hinton de preferinţă), eventual îmbogăţită cu 5/100 sînge de oaie şi însămînţată uniform în suprafaţă cu germenul bolnavului, se plasează discuri de hîrtie de filtru groasă (sau de sugătoare) de 6 mm diametru, înmuiate (şi apoi scurse binişor, prin atingerea de marginea eprubetei) în serul bolnavului, obţinut la diferite intervale după administrarea antibioticului (de ex. : la 1/2—1 oră după administrare, pentru a avea nivelul maxim ; la 4—6—8 ore, pentru a avea nivelurile serice pe parcurs).

În locul discurilor de hîrtie de filtru, se pot utiliza mici cilindri cu 5 mm înălţime şi 4—5 mm diametru, tăiaţi din „paie" de plastic de supt limonadă.

Cercetarea nivelurilor de eficienţă se poate face în ser, în plasmă, în L.C.R. sau în alt produs. Dacă cercetarea se face în urină, aceasta trebuie, în prealabil, neutralizată la pH 7—7,5 şi apoi diluată 1/10 sau chiar mai mult, deoarece antibioticele se concentrează de obicei mult în urină.

După o incubare de 18—24 de ore, se pot citi diametrele zonelor de inhibiţie, iar prin decalc (vezi *4.3.1.8.*) se pot aprecia şi diametrele zonei de bactericidie (vezi fig. 97). Tehnica este departe de a fi precisă, dar totuşi este de mare folos practic. Dacă se observă o zonă de inhibiţie minimă, este probabil că NEI este de ordinul 2—4 ; dacă diametrul zonei de inhibiţie este de 7—8 mm, aceasta corespunde cu un NEI de ordinul zecilor ; dacă diametrul este de 12—15 mm, aceasta corespunde cu un NEI de ordinul sutelor ; diametre ale zonei de inhibiţie mai mari de 20—25 mm corespund cu NEI de ordinul miilor, care nu se pot întîlni de obicei decît uneori în urină.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru determinări mai precise, necesare în unele infecţii, se recurge la metoda diluţiilor (vezi *4.3.2.*).

Uneori, în cazul unor colecţii purulente, se poate observa un fenomen aparent paradoxal, şi anume se constată acolo niveluri antimicrobiene sigur bactericide şi, totuşi, în cultură cresc germenii. Aceasta se datoreşte unor germeni „restanţi" (în repaus metabolic) sau înglobaţi, dar nu omorîţi, în interiorul unor fagocite, unde sînt la adăpostul antibioticelor, care nu pătrund în celule, dar de unde se pot elibera şi prolifera după moartea fagocitelor.

4.3.1.1C. APRECIEREA ORIENTATIVĂ A CONCENTRAŢIEI DE ANTIBIOTICE IN SER, IN L.C.R. SAU IN ALTE PRODUSE

În practica spitalicească, aceste aprecieri se fac în special pentru controlul unui eventual nivel periculos *(controlul nocivităţii tratamentului)*, mai ales la bolnavii cu insuficienţă renală.

Tehnica este aceeaşi, ca aceea de mai sus, cu deosebirea că se foloseşte, în locul germenului de la bolnav, un germen de referinţă (vezi *4.3.1.1.1.3.)* de sensibilitate constantă şi cunoscută, de preferinţă Staphylococcus A.T.C.C. 25923 şi Pseudomonas aeruginosa A.T.C.C. 27583. Nivelurile periculoase şi diametrele corespunzătoare sînt indicate în tabelul XII, dar au doar o valoare orientativă.

Pentru a aprecia mult mai exact, dar şi mult mai laborios, nivelul de antibiotice din ser, se poate (pe o placă mare cu geloză nutritivă însămînţată uniform cu un germen de referinţă) intercala la întîmplare („randomizat"), lîngă probele de la bolnav, şi discuri (sau cilindri de plastic) cu concentraţii cunoscute de antibiotic, care pot fi obţinute prin diluţii binare, plecînd de la o concentraţie de 150 µg/ml (sau U.I./ml) şi pînă la 0,03 µg/ml (sau U.I./ml). Scara etalon de antibiotice poate fi redusă la 4 diluţii, alese în jurul nivelurilor scontate la bolnav. Diametrele zonelor de inhibiţie, obţinute în scara etalon, vor fi înscrise pe o diagramă semilogaritmică, diametrele pe scara aritmetică şi concentraţiile corespunzătoare pe scara logaritmică. Prin aceste puncte, se va trasa o curbă de regresie, cu ajutorul căreia se poate deduce, cunoscînd diametrul obţinut cu produsul pacientului, care este concentraţia de antibiotic care-i corespunde (vezi fig. 86). Dacă scara de antibiotice a fost făcută cu diluţii de antibiotic în bulion, se poate afla nivelul de antibiotic activ (liber), iar dacă diluţiile au fost făcute în ser de om, se află mai degrabă nivelul de antibiotic total (liber şi cuplat). Această tehnică se utilizează în studii de farmacokinezie şi nu în mod obişnuit la bolnav.

În clinică, se determină de obicei NEI şi NEB, iar dozarea de antibiotic rămîne o analiză de excepţie, folosind fie tehnica de mai sus, fie metoda diluţiilor în mediu lichid (vezi *4.3.2.*).

Determinarea sensibilităţii germenilor care cresc încet sau în medii speciale (bacil Koch, anaerobi şi fungi), implică probleme deosebite şi nu cade în posibilităţile de execuţie a clinicianului, în laboratorul său

Scanned with OKEN Scanner

minimal. Față de acești germeni, nu se recomandă metoda difuzimetrică (poate cu excepția Cl. perfringens, care crește repede și a cărui antibiogramă difuzimetrică este în studiu).

4.3.2. METODA DILUȚIILOR

Folosind metoda diluțiilor, se poate determina, în mod direct, cantitativ : CMI și CMB, NEI și NEB, nivelul de antibiotic din ser din alt produs (lichid sau fluidificat în prealabil). Folosind metoda diluțiilor, se poate aprecia, mult mai laborios, dar mai precis, și sinergia, indiferența sau antagonismul bacteriostatic și bactericid între două antibiotice, folosind diluții „în tablă de șah".

Vom descrie doar determinările de CMI și CMB, de NEI și NEB și de nivel de antibiotic într-un produs (de ex., în ser), folosind metoda diluțiilor în mediu lichid, singura care se poate executa relativ ușor în laboratoarele clinice mai slab înzestrate, dar care dă rezultate foarte prețioase în septicemii, endocardite, meningite și în cîteva alte infecții grave.

Metoda diluțiilor în mediu *solid* este mai pretențioasă și mai laborioasă, dar dă rezultate mai precise și mai complete, fiind considerată ca metodă de referință. Ea este utilizată în laboratoarele de profil și pentru cercetări speciale. Se pretează bine pentru studiul mai multor germeni, în mod simultan.

4.3.2.1. DETERMINAREA DE CMI ȘI CMB ÎN MEDIU LICHID PRIN METODA DILUȚIILOR

Diluțiile se fac în bulion nutritiv (de preferință Mueller-Hinton), cu pH 7,2—7,4, și nu în apă distilată sau în soluție salină netamponată, care de obicei fiind acidă poate falsifica rezultatele.

Se întocmește, pentru fiecare antibiotic de cercetat, o primă diluție „primară", care să conțină 1 000 µg (sau U.I.)/ml.

În practica spitalicească curentă, ne putem mulțumi cu antibioticele livrate comercial, luînd drept bună cantitatea indicată pe ambalaj. Exemplu : la 1 fiolă de penicilină G de 400 000 U.I., se adaugă 4 ml bulion (se obțin 100 000 U.I./ml) ; apoi se face o diluție 1/100 și se obțin 1 000 U.I./ml. Alt exemplu : 4 tablete de antibiotic X (250 mg per tabletă) se mojăresc steril în 10 ml bulion (100 mg/ml sau 100 000 µg/ml) ; se face apoi o diluție 1/100 și se obțin 1 000 µg/ml. Dacă antibioticul este termostabil (de ex., cloramfenicol, oligozaharide etc.), soluția poate fi fiartă, înainte de utilizare. Pentru antibioticele termolabile (betalactamine — peniciline și cefalosporine), se va porni de la preparate injectabile.

Pentru lucru, se plasează într-un stativ 2 rînduri paralele de tuburi (de ex., 15), în care se distribuie în fiecare cîte 1 volum (1 sau 0,5 ml) de mediu lichid.

În primul tub, din primul rînd, se adaugă 1 volum din diluția primară de antibiotic. După amestecare, se trece 1 volum în tubul al doilea și se repetă operația pînă la penultimul tub, care rămîne martor

fără antibiotic (fig. 99). Se obţine, astfel, o scară de diluţii aproximative de (μg/ml) : 500 ; 250 ; 125 ; 64 ; 32 ; 16 ; 8 ; 4 ; 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,12 ; 0,06 ; 0,03.

Rîndul al doilea de tuburi rămîne cu mediu fără antibiotic.

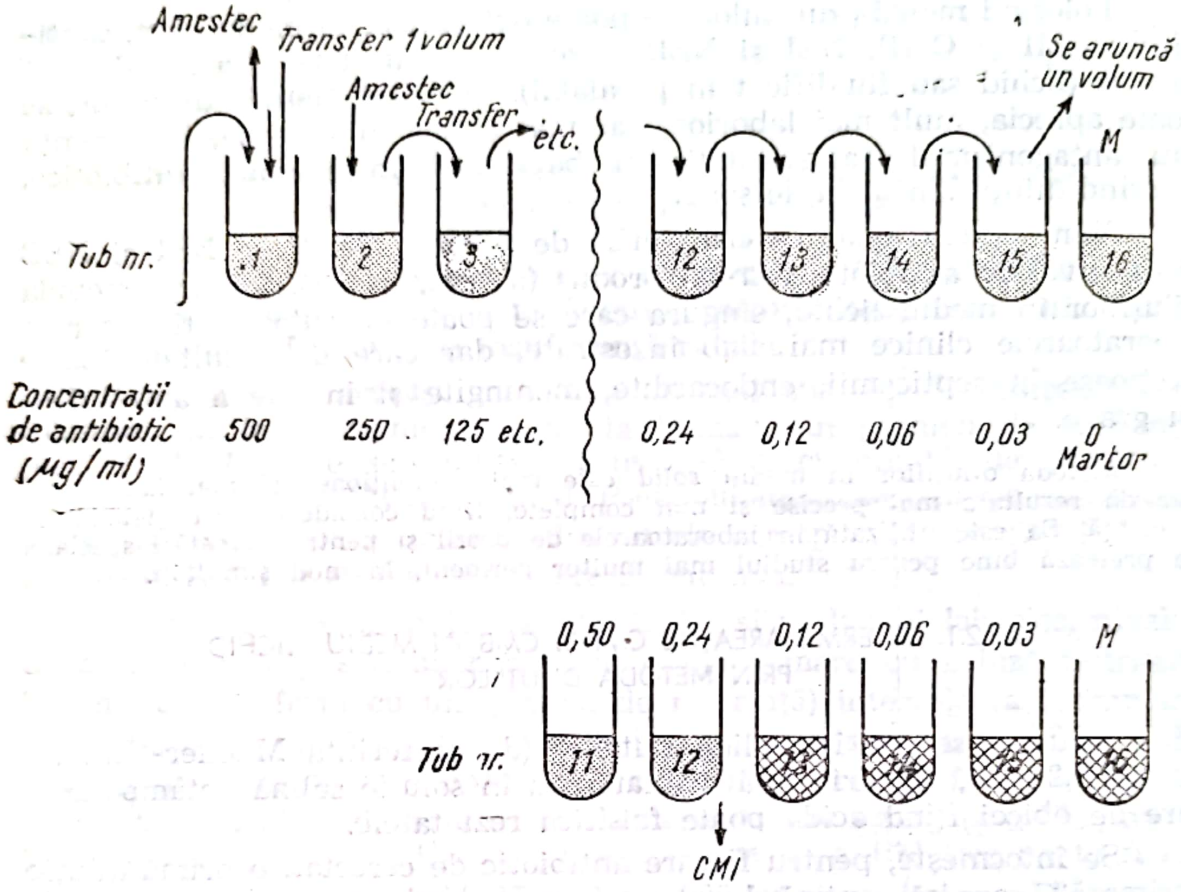


Fig. 99. — Determinarea C.M.I. (pentru C.M.B., vezi fig. 100) *în mediu lichid, prin metoda diluţiilor binare :*

— Se repartizează 1 volum de bulion (0,5 ml) în toate cele 16 tuburi.
—Se adaugă un volum în fiecare tub (afară de martor) din soluţia de antibiotic (concentraţia primară = 1 000 μg/ml).
— Se inoculează toate cele 16 tuburi cu cîte 1 picătură din suspensia microbiană.
— Se incubează la termostat peste noapte.
— Se examinează : ultimul tub, în care nu a crescut germenul, reprezintă C.M.I. (de ex., în ultimele 4 tuburi germenul a crescut, deci C.M.I. = 0,24 μg/ml).

În funcţie de antibiotic şi de însuşirile lui farmacologice (a nivelurilor care pot fi obţinute în organism), numărul tuburilor poate fi redus. De ex. : pentru carbenicilină, se pot folosi doar primele 4 tuburi ; pentru penicilină — ultimele 7 ; pentru majoritatea celorlalte antibiotice — 6 sau 7 tuburi din mijlocul seriei.

Toate tuburile din primul rînd, inclusiv martorul fără antibiotic, sînt inoculate cu o cantitate fixă de germeni, o picătură dintr-o cultură în mediul lichid de 8—16 ore, diluată în aşa fel încît să prezinte o opacitate abia vizibilă (vezi martorul de sulfat de bariu la 4.3.1.1.1.6.) şi care

să conțină teoretic pe inocul aprox. 10^5 unități formatoare de colonii. După însămînțare, tuburile sînt incubate 15—24 de ore la termostat (la 35°). Concentrația de antibiotic existentă în ultimul tub rămas limpede (necrescut) corespunde cu CMI. În continuare, folosind o ansă calibrată și pornind de la diluția cea mai mare din tuburile rămase limpezi, se transferă pe rînd, un volum fix din fiecare tub din rîndul întîi, în tubul corespunzător din rîndul al doilea (fig. 100).

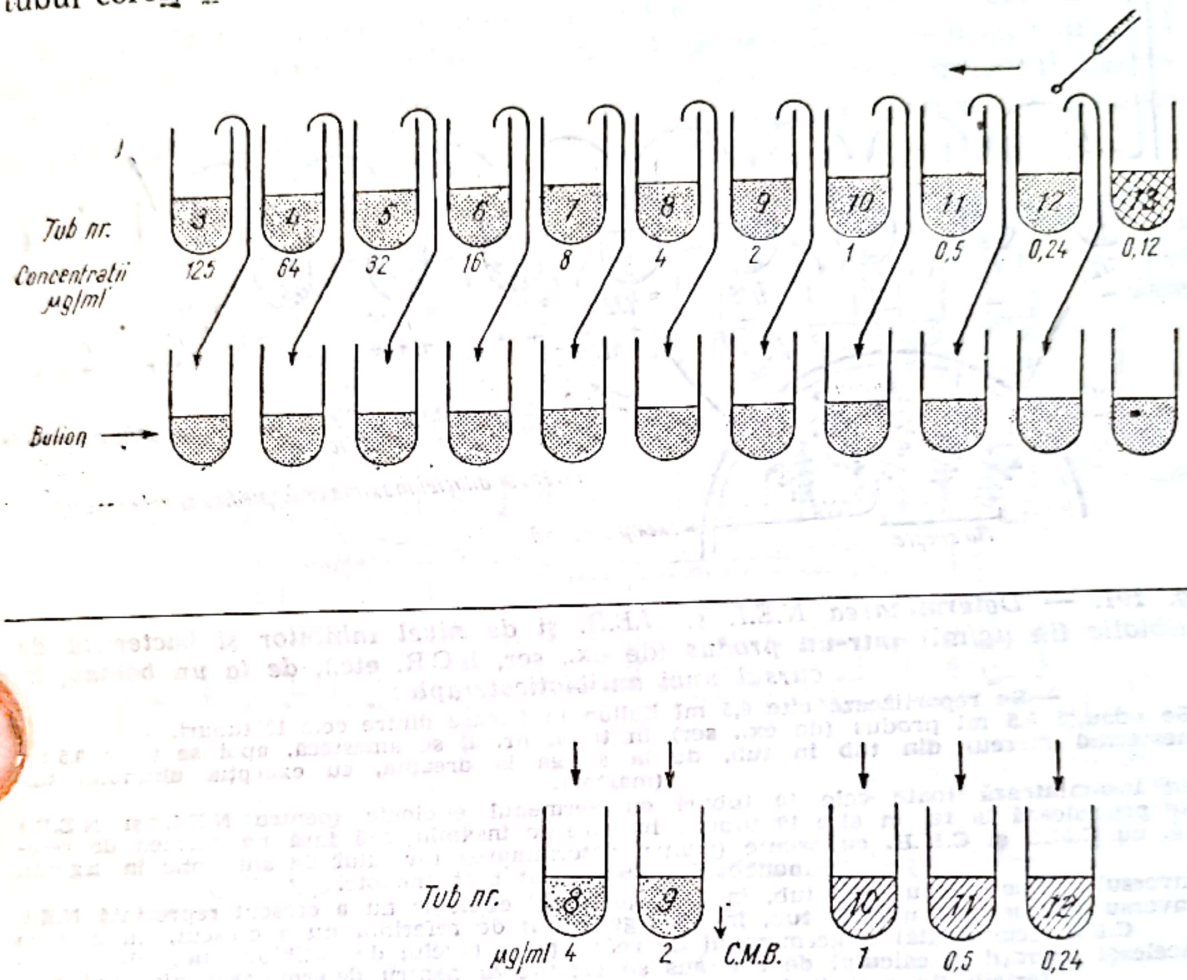


Fig. 100. — Determinarea C.M.B., în mediu lichid prin metoda diluțiilor (vezi și fig. 99) :

— Din tuburile cu diluții de antibiotic în bulion, însămînțate cu germenul respectiv cu 1 zi în urmă, se fac transplante cu ansa, începînd de la concentrația cea mai joasă, în care nu s-a produs o creștere vizibilă, rînd pe rînd în tuburile din rîndul al 2-lea, în care s-a introdus în prealabil cîte 1 volum de bulion.

— Se incubează la termostat peste noapte.

— Se examinează : ultimul tub în care germenul nu a crescut reprezentînd C.M.B. (de ex. : C.M.B. = 2 μ g/ml).

Preferăm transplantul în mediu lichid fără antibiotic și nu pe mediu solid fără antibiotic (cum se practică deseori), deoarece cantitatea de antibiotic transferat cu ansa devine în mediu lichid neglijabilă, din cauza diluției, în timp ce pe geloză ar putea stînjeni creșterea germenilor supraviețuitori, dacă nu avem grije ca picătura transferată pe geloză

să fie mai întîi lăsată să se usuce şi apoi cu o ansă flambată şi răcită să se facă dispersia germenilor în jur pe geloză, fără antibiotic (fig. 101).

Se repun tuburile la termostat şi, după alte 24 de ore, se citeşte rezultatul, apreciindu-se CMB (ultimul tub în care nu s-au dezvoltat germeni) (vezi fig. 100).

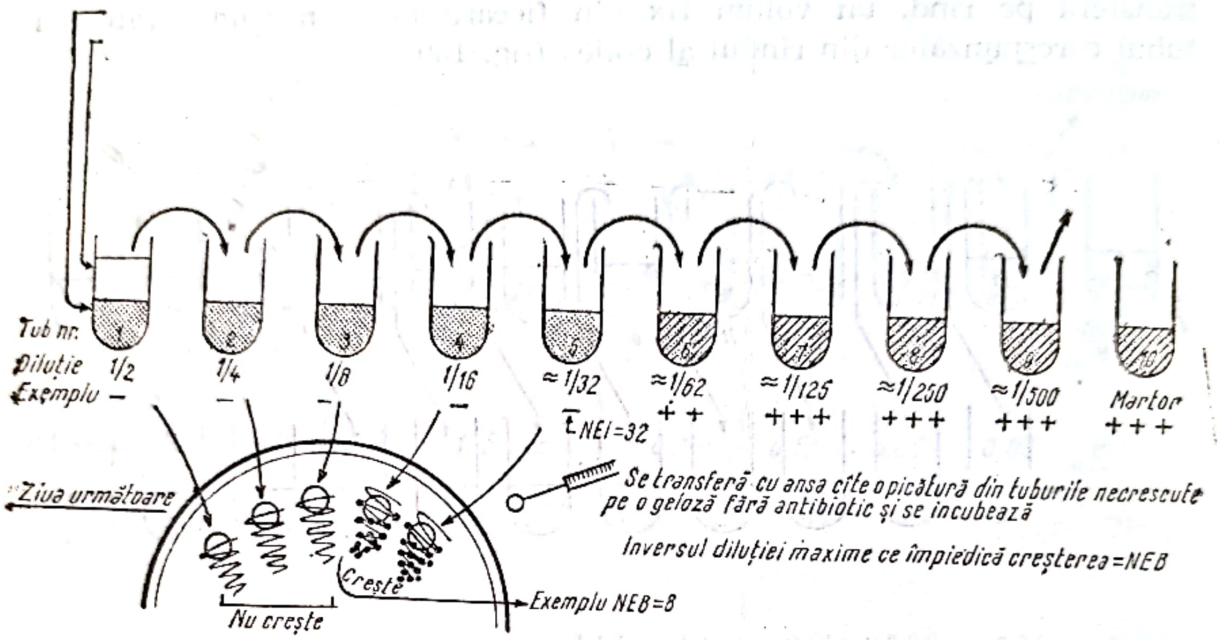


Fig. 101. — Determinarea N.E.I. şi N.E.B. şi de nivel inhibitor şi bactericid de antibiotic (în μg/ml) *într-un produs* (de ex., ser, L.C.R. etc.), *de la un bolnav, în cursul unei antibioticoterapii :*

— Se repartizează cîte 0,5 ml bulion în fiecare dintre cele 10 tuburi.
— Se adaugă 0,5 ml produs (de ex., ser) în tubul nr. 1, se amestecă, apoi se trece 0.5 ml (amestecînd mereu) din tub în tub, de la stînga la dreapta, cu excepţia ultimului tub (martor).
— Se însămînţează toate cele 10 tuburi cu germenul etiologic (pentru N.E.I. şi N.E.B.)
— Se procedează la fel în alte 10 tuburi, în care se însămînţează însă un germen de referinţă, cu C.M.I. şi C.M.B. cunoscute (pentru determinarea nivelului de antibiotic în μg/ml).
— Se incubează la termostat peste noapte.
— Inversul diluţiei din ultimul tub, în care germenul etiologic nu a crescut reprezintă N.E.I.
— Inversul diluţiei din ultimul tub, în care germenul de referinţă nu a crescut, înmulţit cu C.M.I. (cunoscută) a germenului de referinţă = nivelul de antibiotic (μg/ml).
— Aceleaşi operaţii şi calculul de mai sus se efectuează pentru determinarea nivelului bactericid (în μg/ml) în seria însămînţată cu germenul de referinţă.

Rezultatul privind CMB admis, în mod convenţional cu tehnica de mai sus, nu este totdeauna riguros exact, deoarece dacă se prelungeşte incubarea mai multe zile, unii germeni pot supravieţui şi pot reintra într-o fază de multiplicare.

4.3.2.2. DETERMINAREA ACŢIUNII ANTIBACTERIENE A UNOR PRODUSE PATOLOGICE FAŢĂ DE GERMENUL IN CAUZĂ (NEI, NEB) PRIN METODA DILUŢIILOR

În cursul unui tratament (endocardite, septicemii şi în alte cazuri grave) este util să se controleze dacă medicaţia administrată poate asigura niveluri active în ser (plasmă), în L.C.R., sau în alt produs amicrobian şi cu pH în jur de 7,2—7,4. Dacă produsul este infectat, se recurge la metoda difuzimetrică (vezi *4.3.1.*). Cercetarea se face în

momentul cînd se bănuiește că s-au atins *niveluri maxime* (aprox. la 1/4 oră, după o administrare intravenoasă, la 1 oră, după una intramusculară, sau la 2 ore, după una orală), *niveluri minime* (imediat înainte de administrare ulterioară sau la timpuri intermediare). Pentru aprecierea nivelului de eficiență antimicrobiană inhibitorie (NEI) și bactericidă (NEB) a serului față de propriul germen al bolnavului, se fac în mod practic diluții binare de ser în bulion, începînd cu o diluție 1/2, care se însămînțează apoi cu o cultură tînără din germenul bolnavului, la fel ca pentru determinarea de CMI și CMB (vezi *4.3.2.1.*). Se păstrează un tub cu diluția 1/2 sau 1/4 neînsămînțat, pentru controlul sterilității serului, și un tub cu bulion fără ser, pentru controlul inoculului (fig. 102). După o incubare de 18—24 de ore la termostat, se apre-

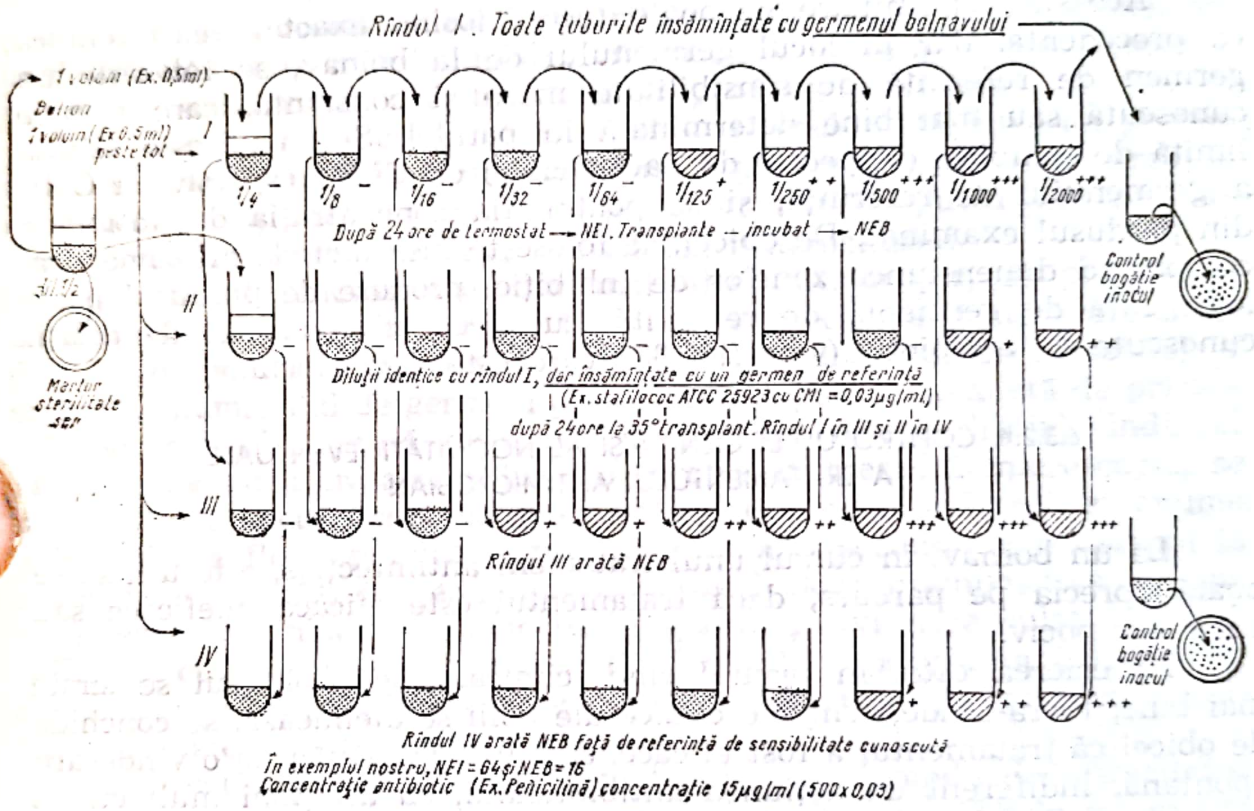


Fig. 102. — Determinarea concomitentă de N.E.I. și N.E.B. și determinarea nivelului (în µg/ml) *de antibiotic* (de ex., penicilină).

ciază NEI, apoi se fac subculturi în mediu fără ser, pentru ca după alte 18—24 de ore de incubație să se aprecieze NEB, ca și în determinarea de CMI și CMB. Rezultatul se exprimă în numere întregi, corespunzător inversului diluției limită, în care se observă acțiunea inhibitorie (respectiv bactericidă). De ex. : NEI = 16 și NEB = 4, înseamnă că serul diluat 1/16 încă mai are un efect inhibitor și diluat 1/4 mai are efect bactericid.

Serul bolnavului poate avea chiar el un efect antimicrobian și, pentru a-l anula, se adaugă pentru fiecare mililitru de ser cîte 5 mg de polianetolsulfonat de sodiu (se pregătesc în prealabil tuburi cu 0,2 ml dintr-o soluție sterilă 50 mg/ml, care se lasă să se usuce la termostat, înainte de introducerea serului în cantitate de 2 ml).

Scanned with OKEN Scanner

Dacă se fac diluţii binare de ser în bulion, primul tub conţine mult ser, iar tuburile următoare din ce în ce mai puţin. Aceasta poate avea o influenţă marcată asupra rezultatului, mai ales pentru antibioticele care se leagă în proporţie mare de proteinele serice. Pe măsură ce proporţia de ser scade din tub în tub, creşte procentul antibioticului liber şi activ, în detrimentul aceluia legat, şi de aceea se obţine un rezultat, care poate fi fals prea mare. S-a propus ca diluţiile să se facă într-un amestec de părţi egale ser fără antibiotic şi bulion, ceea ce însă face tehnica mult mai puţin accesibilă.

4.3.2.3. DOZAREA ANTIBIOTICELOR (BIOLOGIC ACTIVE) ÎN SER, ÎN L.C.R. SAU ÎN ALT PRODUS PRIN METODA DILUŢIILOR

Această determinare se poate face folosind exact aceeaşi tehnică ca precedenta, dar în locul germenului de la bolnav, se foloseşte un germen de referinţă de sensibilitate mare şi constantă, care trebuie cunoscută sau mai bine determinată în paralel. Se înmulţeşte diluţia limită de inhibiţie (respectiv de bactericidie) cu CMI, respectiv cu CMB a germenului de referinţă, şi se poate afla concentraţia de antibiotic din produsul examinat. De obicei, se foloseşte însă metoda difuzimetrică, comparînd dimensiunea zonelor de inhibiţie, produse de produsul patologic faţă de germenul de referinţă, cu aceea a unei scări de diluţii cunoscute de antibiotic (vezi fig. 85), care este mai exactă.

4.3.2.4. CONTROLUL EFICIENŢEI ŞI AL NOCIVITĂŢII EVENTUALE A TRATAMENTULUI ANTIMICROBIAN

La un bolnav, în cursul unui tratament antiinfecţios, este util să se poată aprecia pe parcurs, dacă tratamentul este eficace, ineficace sau dacă este nociv.

Aprecierea este, în primul rînd, clinică. Dacă bolnavul se simte mai bine, febra scade, semnele clinice ale bolii se atenuează, se conchide de obicei că tratamentul a fost eficace, deşi uneori asistăm la o vindecare spontană, indiferent de acţiunea antibioticului, cu atît mai mult cu cît poate s-a administrat un medicament nepotrivit, care nu are acţiune asupra germenului în cauză.

Aprecierea eficacităţii unui tratament poate fi făcută, chiar dacă nu se produce imediat o vindecare, prin ameliorarea senzoriului, tendinţa de scădere a febrei, modificarea produselor septice provenite dintr-un focar infecţios deschis (limpezirea urinii în infecţii urinare sau a L.C.R. în meningite ; schimbarea în bine a aspectului macroscopic al sputei, în infecţiile pulmonare ; scăderea volumului unor scurgeri patologice ; scăderea depozitului de detritusuri celulare, în cazul unui drenaj cu irigaţie şi aspiraţie a unui focar mare septic etc.).

Tot clinica poate justifica bănuiala că un tratament este ineficace, dacă după cîteva zile de tratament susţinut şi dacă nu există un focar infecţios neabordabil, nu s-a produs nici o ameliorare.

Scanned with OKEN Scanner

În sfirșit, examenul clinic repetat pune deseori în evidență nocivitatea unui tratament, prin apariția unor complicații, ca : vărsături ; erupții ; dureri sau abcese la locul injecțiilor ; flebite, zise medicamentoase, care nu rareori sînt septice și foarte periculoase. Efectele adverse care apar, sînt caracteristice pentru fiecare antibiotic în parte (atingere renală, neurotoxicitate, tulburări acusticovestibulare sau oculare, atingere hepatică, tulburări hematologice etc.).

Uneori, este greu de diagnosticat o *febră medicamentoasă,* care apare nu rareori în cursul unor tratamente mai prelungite. Ea poate fi bănuită prin discrepanța între febră și celelalte fenomene clinice și de laborator. Ea poate fi confirmată prin dispariția ei, odată cu suprimarea tratamentului.

Dintre examenele curente de laborator clinic, urmărirea numărătorii și a formulei leucocitare este uneori de mare folos, pentru decelarea unei tendințe către ameliorare sau, dimpotrivă, către agravare. Scăderea vitezei de sedimentare a eritrocitelor se produce mai încet.

În cazuri grave, cu febră neregulată și prelungită, nu este permis să se aștepte o ameliorare imediată prin tratament și, de aceea, trebuie să se recurgă la unele examene de laborator, care ar putea indica eficacitatea, ineficacitatea sau chiar nocivitatea tratamentului.

Examenul macroscopic, dar mai ales microscopic, al produselor patologice este de cea mai mare însemnătate, deoarece poate arăta chiar după o zi modificări citologice (o scădere a numărului de leucocite), o scădere a numărului de germeni (de ex., într-o gonococie acută de primoinfecție la bărbat arată dispariția gonococilor de pe frotiu), indicînd astfel eficacitatea tratamentului. Tot grație examenului microscopic, se poate decela uneori, ceea ce este confirmat ulterior cultural, și anume o înlocuire a florei patologice primitive cu alta secundară, rezistentă la antibioticul utilizat, (de ex., înlocuirea unei flore grampozitive cu una gramnegativă ; înlocuirea unor bacili gramnegativi necapsulați, cum ar fi E. coli, cu alții capsulați, cum ar fi Klebsiella ; apariția unui piocianic ; apariția unor bacili acidoalcoolo-rezistenți ; apariția unor germeni necultivabili pe medii uzuale etc.).

În cazuri grave, în care viața bolnavului depinde de eficacitatea tratamentului antimicrobian, se vor determina NEI și NEB în ser sau în diverse alte produse. Dacă valoarea lor este supraunitară, de ex. 4—16—64, se poate conchide că tratamentul antimicrobian este bine aplicat. Dacă valorile sînt excesiv de mari, peste 100—200, există posibilitatea (dacă nu s-au produs erori de tehnică) unei supradozări sau acumulări nedorite, ducînd la *scăderea eficacității tratamentului* (!) sau la apariția de *reacții adverse.* În cazul unor antibiotice toxice, se determină la nevoie concentrațiile (nivelurile) de antibiotice, pentru a controla dacă nu s-au depășit unele concentrații periculoase (vezi *4.3.2.3.*).

Persistența culturilor pozitive, deși NEI și NEB sînt satisfăcătoare, poate indica o greșeală în utilizarea germenului presupus în cauză, poate indica o înlocuire a germenului primar sensibil, cu altul secundar rezistent sau devenit rezistent ; poate indica existența unui focar septicemic neasanat, care revarsă în continuare germeni în torentul circulator (focar endocardic, proteză valvulară, flebită etc.).

Scanned with OKEN Scanner

Colaborarea clinică-laborator şi executarea unor analize simple, dar judicios alese, asigură de cele mai multe ori urmărirea eficace a tratamentului antimicrobian, permiţînd (după caz) menţinerea, modificarea, înlocuirea sau chiar suprimarea lui.

4.4. CERCETĂRI SPECIALE PENTRU STUDIUL SUBSTANŢELOR ANTIMICROBIENE

O serie de cercetări de strictă specialitate nu pot fi executate decît în laboratoare speciale profilate şi servite de un personal calificat. Tehnicile folosite depăşesc cu mult posibilităţile şi sarcinile laboratoarelor centrale de spital şi cu atît mai mult pe acelea ale laboratorului minimal al clinicianului. Din această cauză, nu le vom descrie, dar vom enumera în mod sumar doar cîteva dintre ele :

— Studiul *in vitro* al relaţiei dintre substanţa antimicrobiană şi bacterii (paraziţi şi fungi).

— Determinări de CMI, folosind tehnici precise de diluţii în mediu solid, faţă de principalele specii microbiene de colecţie, cu aprecierea procentului de inhibiţie la diferite concentraţii de substanţă antimicrobiană.

— Determinarea influenţei pH-ului diferitelor medii, a prezenţei de ser sau sînge, a interferenţei cu alte medicamente sau cu alte substanţe antimicrobiene.

— Repetarea cercetărilor de mai sus cu un număr cît mai mare şi mai variat de germeni sălbatici (prelucraţi imediat în decurs de o săptămînă de la izolare sau conservaţi la —20° sau liofilizaţi).

— Determinarea, în aceleaşi condiţii, a CMB studiindu-se şi curba în timp de inactivare-omorîre şi posibilitatea de „redeşteptare“ şi de multiplicare a germenilor aparent omoriţi, după îndepărtarea substanţei antimicrobiene. Aprecierea procentului de germeni „restanţi“ (neomoriţi, deşi sensibili) etc.

— Cercetări de toxicologie şi farmacologie experimentală pe animale de laborator de diverse vîrste şi stări fiziologice (în special sarcină, alăptare, nou-născut).

— Căi de administrare : orală, subcutanată, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă, intrarahidiană. Absorbţia şi biovalabilitatea.

— Dinamica nivelurilor sanguine şi tisulare (muşchi, ficat, rinichi, oase, L.C.R., creier). Timpul de înjumătăţire. Metabolismul şi inactivarea substanţei. Eliminarea, în special renală, cu determinarea indicelui de epurare a substanţei şi raportul cu indicele de epurare a creatininei. Procentul de legare de proteinele serice şi raportul între acesta şi niveluri sanguine şi tisulare. Volumul aparent de distribuţie. Pătrunderea în L.C.R. şi în focarele septice.

— Toxicitate şi reacţii adverse ; raportul lor cu calea şi doza administrată etc.

Scanned with OKEN Scanner

— Cercetări de terapie pe infecții experimentale, pe animale de laborator cu infecții sistemice, septicemii, endocardite, peritonite, meningite, infecții renale etc.

— După introducerea medicamentului în clinică, se cercetează și se controlează pe om (de diverse vîrste, stări fiziologice și patologice) toate cercetările privitoare la sensibilitatea germenilor în cauză, față de diferitele substanțe antimicrobiene, precum și cercetările care s-au făcut experimental (vezi mai sus). Se caută relații între cercetările experimentale *in vitro*, pe animale și infecții experimentale. Determinarea nivelurilor obținute la bolnav și surprinderea reacțiilor adverse constituie o preocupare permanentă și importantă, mai ales în anumite boli grave.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 1

Coloranți și soluții tampon

Se utilizează numai sticlărie perfect curată și apă distilată.

Soluțiile alcoolice saturate (*soluții-mamă*) de *albastru de metilen*, de *violet de gențiană*, de *cristal violet*, de *violet de metil* sau de *fucsină bazică* se prepară toate la fel, și anume: 6—10 g colorant se mojarează cu cca 20—30 ml alcool etilic 96°. Se varsă supranatantul colorat într-o sticlă perfect curată. Se adaugă, treptat, peste colorantul nedizolvat, alcool, mojarînd în continuare și decantînd supranatantul, pînă ce s-a completat volumul de 100 ml alcool și s-a spălat tot colorantul. Soluția se păstrează o săptămînă la termostat, agitînd din cînd în cînd. Se filtrează. Soluțiile-mamă pot fi păstrate mult timp. Pentru lucru, se diluează 10 ml soluție-mamă în 90 ml apă distilată fenolată 2% și se filtrează. Soluțiile apoase nu se păstrează decît puțin timp.

Albastru de metilen Loeffler

Soluție alcoolică saturată de albastru de metilen	30 ml
Soluție NaOH 1/100 apă distilată	1 ml
Apă distilată	100 ml

Se folosește curent, fie ca singur colorant, fie pentru coloraţia Ziehl.

Albastru de metilen Manson (cu borax); de recomandat

Borax (borat de Na)	25 g
Apă distilată caldă	600 ml
Se încălzește pînă se dizolvă	
Albastru de metilen	5 g

Se ţine 2—4 zile la termostat, agitînd din cînd în cînd. Se mai ţine 3—6 zile la lumină. Se folosește curent, fie singur (colorează ușor metacromatic), fie înlocuind albastrul din coloraţia Ziehl.

Albastru de metilen tamponat acid pentru coloraţie umedă de paraziți

pH-ul și cantitatea de albastru variază, în oarecare măsură, în funcţie de calitatea albastrului. De obicei, albastrul de metilen 0,06 g (sau 0,6 ml din soluţia-mamă), dizolvat în 100 ml tampon acetat, cu pH 3,6—4,2 (de obicei, pH 3,6).

Tampon acetat

Soluția A: Sol. 0,2 mol. acid acetic (11,55 ml în 1 000 ml apă distilată)
Soluția B: Sol. 0,2 mol acetat de sodiu (16,4 g $C_2H_3O_2Na$ sau 27,2 g $C_2H_3O_2Na.\ 3\ H_2O$ dizolvat în 1 000 ml apă distilată).

pH	Sol. A	Sol. B	Apă distilată 100 ml
3,6	46,3	3,7	,,
3,8	44,0	6	,,
4,0	41,0	9	,,

Se amestecă bine pe o lamă de sticlă portobiect o mică cantitate de scaun cu o picătură mare de albastru de metilen tamponat. Se pune o lamelă, care se parafinează pe margini. După 5—10 minute, nucleii trofozoizilor apar colorați în albastru și citoplasma colorată în albastru palid. Examinarea trebuie făcută în decurs de 1/2 oră.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 2

Coloraţia Gram (modificată)

1) *Cristal violet*

Soluţia A:	Cristal violet	2 g
	Alcool etilic 95°	20 ml
Soluţia B:	Oxalat de amoniu	0,8 g
	Apă distilată	80 ml

Se amestecă sol. A cu sol. B, se lasă 24 de ore, apoi se filtrează şi este gata de utilizare.

2) *Lugol*

Iod	1 g
Iodură de potasiu	2 g
Apă distilată	300 ml

De păstrat în sticlă colorată.

3) *Soluţia de decolorare*

Alcool etilic 95°	50 ml	Proporţii obişnuite
Acetonă	50 ml	

(Proporţia poate fi modificată. Prima soluţie decolorează încet, a doua mai repede).

4) *Coloraţia de fond*

Soluţia-mamă

Safranină 0	2,5 g
Alcool etilic 95°	100 ml
Pentru lucru: Soluţia-mamă	10 ml
Apă distilată	90 ml

Se colorează cu violet 1 minut, se spală repede, se scurge excesul de apă, se acoperă cu lugol 1 minut, se spală, se decolorează repede. Se colorează fondul cu safranină 10 secunde (de controlat).

N.B. În locul safraninei, se poate utiliza o soluţie de fucsină, diluată extemporaneu 1/10 în apă distilată.

Pentru coloraţia Gram pe secţiuni histopatologice, vezi *2.11.0.0.3.1.*

Coloraţia Ziehl

1) Soluţie alcoolică saturată de fucsină bazică 10 ml
Sol. fenol lichefiat 5 g/100 apă distilată 100 ml
Se filtrează.

Se colorează la cald, pînă la degajare de vapori, dar nu la fierbere, timp de 8—10 minute.

2) Se spală cu apă.

Scanned with OKEN Scanner

3) Se decolorează cu: HCl concentrat 3 ml
Alcool etilic 95° 97,0 ml
până preparatul rămîne albicios.
4) Se spală cu apă.
5) Se colorează de fond 10—20 secunde cu:
Soluţie de albastru de metilen 3—10 ml
Apă distilată q.s. 100 ml
sau cu:
Acid picric sol. apoasă saturată } āā 50 ml
Alcool etilic 95°

Coloraţie de fond este mai slabă, palidă; se disting mai bine bacilii Koch, în unele preparate.

Pentru coloraţia Gram şi Ziehl în ţesuturi, vezi *2.11.0.0.3.1.* şi *2.11.0.0.3.2.*

Coloraţia May-Grünwald-Giemsa

Fixare cu sol. May-Grünwald 3 minute
Apă distilată neutră 1 minut
(eventual tamponat la pH 7)
Sol. Giemsa 10 picături } 20—30 minute
Apă distilată neutră 10 ml }
Se spală, se examinează.

Coloraţia Giemsa simplă (*pentru picătura groasă*)

Sol. Giemsa 10 picături } 20—30 minute
Apă distilată 10 ml }

sau după hemoliză cu apă distilată şi fixare cu alcool metilic 3 minute, se colorează cu sol. Giemsa ca pentru coloraţii de frotiuri de sînge.

Coloraţia Field

Fixare cu alcool metilic 3 minute
Se lasă să se usuce.
Soluţia Field A 1 secundă
Se clăteşte repede în apă distilată.
Soluţia Field B 1 secundă
Se spală repede în apă distilată (dacă frotiul apare prea roşu se retrece în Field A şi se spală. Preparatul trebuie să aibă o culoare violet).

Soluţii tampon pentru coloraţii hematologice şi pentru malarie:

Soluţia A 0,067 mol fosfat disodic

Na_2HPO_4 9,5 g
Apă distilată 1 litru

Soluţia B 0,067 mol fosfat monosodic

$NaH_2PO_4 \cdot 2\,H_2O$ 9,2 g
Apă distilată 1 litru

	Sol. A.	*Sol. B.*	*Apă*
pH 7	61,10 ml	38,9 ml	900 ml
pH 7,2	72,00 ml	28,0 ml	900 ml
pH 7,4	27,00 ml	73,0 ml	900 ml

Colorant Pavlovski (*pentru rinocitodiagnostic în gripă*).

A) Sol. alcoolică saturată de *albastru de metilen*
B) Sol. alcoolică saturată de *fucsină bazică*
Menținere 2—3 zile la 37°.
Reactiv de lucru : 10 ml apă distilată
Sol. fucsină bazică 1 picătură
Sol. albastru de metilen 5—8 picături (de tatonat)

Eozină (pentru examenul coproparazitar)

Sol. eozină 2 g/apă 100

Soluție Ringer lactozată

Clorură de sodiu	8,5 gg
Clorură de potasiu	0,20 gg
Clorură de calciu	0,20 gg
Carbonat de calciu	0,01 gg
Lactoză	10,00 g
Apă distilată	1 000 ml

Pentru spălat — decontaminat sputa.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 3

Anticoagulante

EDTA (etilen-diamin-tetra-acetic)

disodic	1,5 g
Apă distilată	100,0 ml

Se repartizează cîte 0,2 ml în sticluțe de penicilină perfect curate și uscate. Se plimbă soluția pe fundul sticluței, apoi se lasă peste noapte la termostat. Se obțin astfel flacoane cu 3 mg EDTA uscat, în care se recoltează 2 ml sînge. Se amestecă bine, ca să se obțină un sînge necoagulat.

Amestec de oxalați Wintrobe

Oxalat de potasiu	0,8 g
Oxalat de amoniu	1,2 g
Apă distilată	100,0 ml

Se repartizează cîte 0,2 ml în sticluțe de penicilină perfect curate și uscate. Se lasă să se usuce peste noate la termostat. În flacoanele astfel pregătite, se pot recolta (ca mai sus) 2 ml sînge, care devine necoagulabil.

Citrat de sodiu

Citrat de sodiu	3,8 g
Apă distilată	100,0 ml

Soluție de citrat	1 ml
Sînge	4 ml

Se obține un sînge necoagulabil.

Lichide de diluție pentru numărători de elemente figurate sanguine

Pentru leucocite	Apă distilată	100 ml
	Acid acetic glacial	1 ml
	Albastru de metilen	1/100 1—2 picături
Pentru eritrocite	NaCl	0,85 g
	Apă distilată	100,00 ml
	Eozină sol. 1/100	1—2 picături
Pentru trombocite	Oxalat de amoniu	1 g
	Na_2 EDTA	0,010 g
	Apă distilată	100,00 ml
Pentru eozinofile	Eozină sol. 1/100 în apă	2,5 ml
	Acetonă	2,5 ml
	Apă distilată	45,0 ml

Scanned with OKEN Scanner

Reactiv pentru colorat reticulocitele

Briliant cresylblau	1 g
Na citric	0,4 g
Ser fiziologic	100,0 ml

Lichide de diluţie pentru dozări de antibiotice

Se utilizează fie *bulion simplu*, cu pH 7,2—7,4, fie *apă distilată tamponată*, cu pH 7,2—7,4.

pH 7,2	PO_4HNa_2	2,0 g
	PO_4KH_2	0,5 g
	Apă distilată	1 000,0 ml
pH 7,4	$PO_4H_2Na + 2\,H_2O$	12,3 g
	PO_4HNa_2	11,2 g
	Apă distilată	1 000,0 ml

Nu se va folosi ser fiziologic (netamponat), care este întotdeauna acid!

Reactivi

Soluţie iodurată pentru parazitologie

Iod cristalizat	1,5 g
Iodură de potasiu	1,0 g
Apă distilată	100,0 ml

Se mojarează împreună şi se conservă în sticlă curată cu dop rodat de sticlă. Soluţia este bună, atîta timp cît rămîne un exces de iod pe fund. Dacă se deschide la culoare, se reface soluţie proaspătă. Se utilizează în preparat umed, punîndu-se o picătură la marginea unui preparat, între lamă şi lamelă.

Se începe colorarea cu soluţia iodurată diluată 1/5, apoi la nevoie cu soluţia-mamă.

Preparat Kato-Miura, pentru ouă de paraziţi:

Glicerină	50 ml
Apă distilată	50 ml
Verde malachit (sol. apoasă 3/100)	0,5 ml

Se scufundă în soluţie dreptunghiuri de celofan de 3/4 cm. După 24 de ore, acestea se pot utiliza.

Soluţia Pandy

Acid fenic cristalizat, lichefiat la cald	8 g
Apă distilată	100 ml

Se agită, se lasă la termostat 4—5 zile. Se utilizează lichidul clar supranatant.

Reactiv Benedict, pentru decelat glucoza în urină

Citrat de sodiu	85 g
Carbonat de sodiu anhidru	50 g
Apă	400 ml

Scanned with OKEN Scanner

După dizolvare, se adaugă sulfat de cupru 8,5 g dizolvat în 50 ml apă fierbinte, se completează cu apă distilată la 500 ml.

Mediu de cultură pentru antibiogramă

Geloză Mueller-Hinton (original)

Infuzie dehidratată din 300 g carne de vacă	
Digestie acidă de cazeină	17,5 g
Amidon de malţ	1,5 g
Agar	17,5 g
Apă distilată	1 000,0 ml
pH după autoclavare	7,4

Va conţine 20—35 mg Mg^{++}
50—100 mg Ca^{++} la litru

Standard turbidimetric de sulfat de bariu
pentru potrivirea inoculului la antibiograme

Sol. A: Soluţie 1/100 $BaCl_2$ (= 0,048 mol/l.$BaCl_2$)
1,175 g $BaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ dizolvat în 100 ml apă distilată.
Sol. B: Soluţie 1/100 v/v H_2SO_4 (= 0,18 mol/l $\cdot H_2SO_4$)
Se amestecă 0,5 ml din A în 99,5 ml B. Se agită bine, se toarnă într-un tub 10/100 de sticlă neutră şi se închide bine (de preferat sudat). Martorul de turbiditate poate fi conservat 6 luni. Se agită foarte bine, înainte de utilizare.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 4

METODE ARTIZANALE DE PREPARARE A DISCURILOR ȘI A PULBERILOR CU ANTIBIOTICE PENTRU ANTIBIOGRAME, ÎN LIPSA DISCURILOR STANDARDIZATE

Pentru discuri. Se folosește hîrtie sugătoare albă groasă, spălată de 3—4 ori în apă distilată neutră și lăsată să se usuce bine la 20—35°, din care se decupează discuri de aprox. 6 mm diametru.

Se fac diluții, în apă distilată tamponată (sau în alcool metilic „uscat", adică fără apă, pentru peniciline și cefalosporine), ale antibioticelor de studiat, fie pornind de la soluții injectabile, fie de la tablete sau cașete, luînd drept bună cantitatea per fiolă sau per tabletă, indicată de fabricant. Dacă se pleacă de la tablete, se cîntăresc 4 tablete, care vor fi bine mojarate împreună, apoi se prelevează o cantitatea corespunzătoare cu 0,02 g substanță activă. Soluția se face, astfel, pentru a avea 1 000 µg/ml (sau U.I./ml). Aceasta va servi drept soluție-mamă.

Separat se adaptează, prin intermediul unui scurt tub de cauciuc, un ac subțire de injecții subcutanate la o pipetă gradată de 1 ml. În continuare, se „calibrează" acul lăsînd să pice din pipetă apă distilată (respectiv alcool metilic) și numărînd picăturile pe ml. Se ajustează prin diluția de lucru de antibiotic, pentru a avea per picătură cantitatea de antibiotic specificată în tabelele O.M.S. pentru fiecare disc.

Pe o placă de plexi sau de sticlă, acoperită cu o foaie de piastic, care nu se udă, se răspîndesc discurile de hîrtie sugătoare indicate mai sus și se lasă să pice pe fiecare cîte o picătură din soluția de lucru de antibiotic.

Placa cu discuri se pune la termostat sau, mai bine, la exicator și se lasă să se usuce (această tehnică a fost utilizată ani de zile cu succes, în Suedia, de prof. H. M. Erickson).

Pentru pulbere, se prepară prin mojarare pulbere de amylicum tripticum care se amestecă prin mojarări repetate și îndelungate cu antibioticele, care se vor utiliza, pentru a obține pînă la urmă concentrații de 5 mg/g. pentru antibioticele oligozaharide, de 8 mg/g, pentru cloramfenicol și tetraciclină, de 10 mg/g, pentru carbenicilină, și numai de 2 mg/g pentru penicilină, și de 1 mg/g, pentru oxacilină.

Pulberile astfel obținute vor fi încercate repetat față de germenii de referință, pentru a afla dimensiunea zonelor de inhibiție produse.

Pentru a conferi o valoare acceptabilă pulberilor, se vor utiliza întotdeauna în tehnica comparativă.

Pulberile se utilizează în loc de discuri, plasînd pe mediul însămînțat cu germeni de referință și cu cel de studiat o mică grămăjoară de aprox. 4—5 mm diametru.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTATĂ

ANDERSON T. G. — Manual of Clinical Microbiology, Ed. Blair I.E. Lenette E.M. Truant J.P. Betherta (1970), American Society for Microbiology.

BABU J. P., SCHELL R. F., LEFROCK J. L. — Evaluation of Twenty Three Blood Culture Media, *J. clin. Microb.*, 1978, *8*, 288—292.

BAILEY AND SCOTT'S FINEGOLD S. M., MARTIN W. J., SCOTT E. G. — Diagnostic Microbiology, Ed. a V-a, 1978, C. V. Mosby Co., Saint Louis (S.U.A.).

BALŞ M. — Testarea sensibilităţii germenilor la antibiotice, *Viaţa med.*, 1976, *23*, 207.

BALŞ M. — Problema nerezolvată a antibiogramelor şi propuneri de imbunătăţire, *Viaţa med.*, 1980, *3*, 101—106.

BAUER T. W., KIRBY W. M., SHERRIS J. C., TURCK M. — Antibiotic susceptibility testing by a standard disk method, *Amer. J. clin., Path.*, 1966, *45*, 493.

BAUER J. D., ACKERMANN P. G. — „Clinical laboratory Methods", Ed. a 8-a (1974), C. V. Mosby Co., Saint Louis (S.U.A.).

* * * — Bayer Leverkusen. Kurze mikroskopische und chemische Diagnostick für die Tropen ärztliche Praxis (1942), Leverkusen.

BELL S. M., WOOD R. — An antibiotic assay method, *J. med. Lab. Technol.*, 1968, *25*, 2.

BARBIN G. K., THORLEY J. D., REGINARD J. A. — Simplified Microscopy for rapid detection of significant Bacteriuria in random urine specimens, *J. clin. Microb.*, 1978, *7*, 286—291.

* * * — „Blood cultures", Committees American Soc. for Microbiology (1974), Washington D. C. 20 006.

BOCÂRNEA C. — Rinocitodiagnosticul gripei, *Viaţa med.*, 1968, *15*, 1 473—1 478.

BURROW'S Textbook of Microbiology, Ed. a 20-a, 1973, W. B. Saunder's Co. Philadelphia-London-Toronto.

BUIUC D., COMAN GABRIELA — Bacteriologie practică, Ed. a VI-a, (1977), I.M.F. — Iaşi.

CĂRUNTU FL., HAGIESCU LUCIA — Tehnică simplificată de urocultură semicantitativă. Studiu comparativ cu alte două tehnici uzuale de urocultură, *Viaţa med.*, 1976, *8*, 243.

CĂRUNTU FL., CĂRUNTU VERONICA — Vademecum de boli infecţioase, Ed. medicală, Bucureşti (1979).

CĂRUNTU FL. — Test simplificat al catalazelor pentru diagnosticul infecţiilor urinare, *Viaţa med.*, 1970, *9*, 407.

CĂRUNTU FL., MERMEZAN ELENA — Hemocultura cu vacuum în diagnosticul septicemiilor şi al endocarditelor bacteriene. Studiu comparativ pe 781 hemoculturi, *Viaţa med.*, 1978, *25*, 19.

CĂRUNTU FL. — Transportul şi conservarea materialelor patologice (1980), (Comunicare personală).

CĂRUNTU FL. — Metodă practică de dozare a antibioticelor în singe și diverse produse patologice, *Viața med.*, 1969, *16*, 183.

CAVALO R. J. — Parasitologie. Les protosoaires, les helminthes, les arthropodes (1975), Ed. Riotton, Genève.

CHABBERT Y. — L'antibiogramme (1963), Gaignault, Indre, France.

CHABBERT Y. — Les concentrations actives d'antibiotiques au site de l'infection. VI-ème Congrès International de Pathologie Clinique, Rome (1966).

CHABBERT Y., BOULINGRE H. — Modifications pratiques concernant le dosage des antibiotiques en clinique, *Rev. franç. Etud. clin. biol.*, 1957, *2*, 636.

DĂNCESCU P., LIVIU T. — Diagnosticul de laborator în boli parazitare, I.M.F. — București, 1978.

ERRICSKON H. M., SHERRIS I. C. — Antibiotic sensibility testing, *Acta path. microbiol. scand.*, 1971, (Suppl.) 1—90.

* * * — Expert Committees on Biological Standards, Technical Report Series, Nr. 610, O.M.S., Genève, 1977.

GARROD L. P., WATHERWORTH P. M. — Effect of medium composition on the apparent sensitivity of Pseudomonas aeruginosa, *J. clin. Path.*, 1969, *22*, 534.

GARROD L. P., WATHERWORTH P. M. — A study of antibiotic sensitivity testing with proposal for simple uniform methods, *J. clin. Path.*, 1971, *24*, 779.

GRADWAHL'S Clinical laboratory methods and diagnosis, San Franckel, Stanley Reitman & Alex. Sounenwirth, Ed. a 7-a, (1970), Mosby Co., St. Louis (S.U.A.).

HALL M. MARSHAL, DANIE M. ILSTRUP, JOHN A. WASHINGTON — Comparison of three blood cultures media with tryptic Soy broth, *J. clin. Microb.*, 1978, *8*, 299—301.

HALMANN L. — Klinische Mikrobiologie, Ed. a 4-a (1974), Georg Thieme Verlag, Stuttgard.

LENNETT E. D. și colab. — Manual of clinical Microbiology, Amer. Soc. Microb., Washington (1974).

* * * — Laboratory Diagnosis of urinary tract infection (1975) No. 2, Commitees Amer. Soc. Microb., Washington D.C. 20006.

* * * — Laboratory Diagnosis of lower Respiratory Tract Infection (1978) no. 7, Committees Amer. Soc. Microb., Washington.

* * * — Laboratory Diagnosis of upper Respiratory Tract Infections (1979) no. 10, Committees Amer. Soc. Microb., Washington.

* * * — Metode de laborator de uz curent, Vol. II, Ministerul Sănătății și Academia de Științe Medicale, Ed. medicală, București (1977).

MOFFET HUGH L. — Clinical microbiology, J. E. Lippincott Co., Philadelphia-Toronto (1975).

* * * — New Developments in antimicrobial agents susceptibility testing (1977), nr. 6, Committees Amer. Soc. Microb., Washington.

NITZULESCU V., CORIJESCU V. — Analiza coproparazitologică. Ed. medicală, București (1976).

* * * — O.M.S. — Technical Report Series, Nr. 610 (1977), Requirements for antibiotic susceptibility test discs.

* * * — O.M.S. Guide pour l'antibiogramme (1979).

* * * — Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests approuved standard A.S.M. 2, S.U.A. (1975).

PEARSON C. H., WHITEHEAD J. E. — Antibiotics sensitivity. A modification of the Stokes method using rotary plates, *J. clin. Path.*, 1974, 27, 430.

* * * — Practical anaerobic Bacteriology (1977), Committees Amer. Soc. Microb., Washington.

Scanned with OKEN Scanner

* * * — Report of a Collaboratory Study. Antimicr. Agents and Chemoterapics, Ed. Churchill Livingstone, Edinburg-London-New York (1978).

RUSSU V. — Norme standard pentru determinarea sensibilității la agenții antimicrobieni prin metoda difuzimetrică, *Bios*, Nr. 1 (1979), Inst. Cantacuzino, București.

STOKES J. E. — Clinical bacteriology, Ed. Edward Arnold, London (1968).

STOKES J. E., WATHERWORTH P. M. — Association of clinical Pathology Broodsheet Nr. 55 (Revised) (1972).

STOKES J. E. — Clinical bacteriology, Ed. Edward Arnold, London (1975).

* * * — Significance of medical Microbiology in the care of patients, Victor Lorian Edit., William & Wilkins Co., Baltimore (1977).

TODD, SANFORD, DAVIDSOHN — „Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods", John Bernard, Hans M. I. Ed. a 16-a (1979), W. D. Saunder's Co. Philadelphia, London-Toronto.

TROBISHER & FUERST'S „Microbiology in Health and Disease, Ed. a 14-a (1978), W. B. Saunder's Co., Philadelphia-London-Toronto.

ȚIȚEICA MARIA — Lucrări practice de hematologie, imunologie, I.M.F., București (1975).

ȚIȚEICA MARIA — Imunologie clinică. Metode de laborator, I.M.F. — București (1975).

ZAMFIRESCU-GHEORGHIU MARCELA și colab. — Îndrumător pentru teste simple și procedee simplificate în chimia clinică, I.C.C.F., București (uz intern), 1980.

BIBLIOTECA JUDETEANA „GH.ASACHI" IASI

Scanned with OKEN Scanner

ERATĂ

Pagina :	*Rîndul :*	*În loc de :*	*Se va citi :*
142	9 de jos	calitate	cantitate
197	14 de sus	0,18 g	1,18 g
267	4 de sus	preferință	referință

Laboratorul clinic în infecții

Scanned with OKEN Scanner